

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV
Klinik der Ludwig – Maximilians – Universität München

Klinischer Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

**Evaluierung von HSP90 als neue Zielstruktur und
HSP90 Inhibitoren als verbesserte
Behandlungsoption für das
Nebennierenrindenkarzinom**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig – Maximilians – Universität zu München

Vorgelegt von
Claudia Langer
(geb. Siebert)
aus Dessau – Roßlau
2020



Mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:

Prof. Dr. med. Felix Beuschlein

Mitberichterstatter:

Prof. Dr. Stefan Bornstein

PD Dr. George Vlotides

Prof. Dr. Klaus Hallfeldt

Dekan:

Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung:

27.11.2020



„Unsere größte Schwäche liegt im Aufgeben. Der sicherste Weg zum Erfolg ist immer,
es doch noch einmal zu versuchen.“

Thomas A. Edison



Eidesstattliche Versicherung

Langer, Claudia

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Evaluierung von HSP90 als neue Zielstruktur und HSP90 Inhibitoren als verbesserte Behandlungsoption für das Nebennierenrindenkarzinom“ selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 16.12.2020

Claudia Langer

Ort, Datum

Name, Unterschrift



Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	1
1. EINLEITUNG	4
1.1 DIE NEBENNIEREN UND DAS NEBENNIERENRINDENKARZINOM.....	4
1.1.1 Physiologischer Aufbau und Funktion der Nebennieren	4
1.1.2 Pathophysiologie der Nebennierenrinde	5
1.1.3 Nebennierenrindenkarzinom (NNRK)	6
1.2 HEAT SHOCK PROTEIN 90 (HSP90) UND SEINE INHIBITOREN.....	9
1.2.1 Schematischer Aufbau und Funktionen des HSP90 Moleküls	9
1.2.2 Die Rolle von HSP90 bei Tumorerkrankungen.....	12
1.2.3 HSP90 Inhibitoren.....	13
2. ZIELE DER ARBEIT	18
3. MATERIALIEN	20
3.1 GERÄTE / EQUIPMENT	20
3.2 CHEMIKALIEN.....	23
3.3 KITS UND ASSAYS.....	25
3.4 MEDIEN UND REAGENZIEN.....	25
3.5 HERSTELLUNG VON PUFFERN UND LÖSUNGEN	27
3.6 ANTIKÖRPER	34
3.6.1 Primäre Antikörper	34
3.6.2 Sekundäre Antikörper	36
3.7 SOFTWARES, DATENBANKEN UND INTERNETANWENDUNGEN.....	36
4. METHODEN	37
4.1 HISTOLOGISCHE METHODEN	37
4.1.1 Verarbeitung von Nebennierenrindenkarzinom Xenograftgewebe.....	37
4.1.2 Immunhistochemie (IHC) von HSP90 α/β und HSP90 β an Nebennierenrindenkarzinom Xenograftgewebe.....	38
4.1.3 Immunfluoreszenzfärbung (IF) an Nebennierenrindenkarzinomzelllinien	39
4.1.3.1 Aussäen und Fixierung unbehandelter Nebennierenrindenkarzinomzelllinien	39
4.1.3.2 IF Färbung HSP90 α/β und HSP90 β in NCI – H295R und MUC – 1 Zellen	39
4.1.3.3 IF Färbung ERK1/2 und p – ERK1/2 in MUC – 1 Zellen.....	40
4.2 IN VITRO EXPERIMENTE AN HUMANEN NEBENNIERENRINDENKARZINOMZELLEN.....	41
4.2.1 Kultivierung der Nebennierenrindenkarzinomzelllinien	41
4.2.2 Auszählen von NNRK Zellen	41
4.2.3 Behandlung der NNRK Zelllinien mit HSP90 Inhibitoren und mittels EDP – M.....	42

4.2.3.1 Zellviabilitäts – Assay	42
4.2.3.2 Zellproliferations – Assay	48
4.2.3.3 Apoptose – Assay	48
4.2.3.4 Zellmigrations – Assay	48
4.3 PRIMÄRKULTUR NNRK (IN KOOPERATION MIT DR. NÖLTING)	49
4.3.1 Krankheitsgeschichte des Patienten	49
4.3.2 Gewinnung der Primärkulturzellen und Behandlung mit Luminespib und Ganetespib	49
4.4 PROTEINBIOCHEMIE (IN KOOPERATION MIT DR. CIATO)	50
4.4.1 Proteinextraktion	50
4.4.2 SDS – Gelelektrophorese und Western Blot	51
4.5 QUANTIFIZIERUNG DER STEROIDSYNTHESE	51
4.6. STATISTISCHE ANALYSE	53
5. ERGEBNISSE	54
5.1 EXPRESSION UND LOKALISATION DER ZIELSTRUKTUR HSP90	54
5.2 AUSWIRKUNG EINER HSP90 INHIBITION AUF DIE EXPRESSION VON HSP90 UND GR	56
5.3 EFFEKTE VON HSP90 INHIBITOREN AUF ADRENOKORTIKALE ZELLINIEN (EINZELDOSIERUNGEN)	58
5.3.1 Zellviabilität	58
5.3.2 Proliferation	60
5.3.3 Apoptose	62
5.3.4 Zellmigration	64
5.4 EFFEKTE VON LUMINESPIB UND GANETESPIB AUF ADRENALE PRIMÄRKULTUREN	66
5.5 EFFEKTE VON HSP90 INHIBITOREN UND WIRKSTOFFEN DES EDP – M SCHEMAS AUF NNRK ZELLINIEN	67
5.5.1 Bestimmung des Behandlungszeitpunktes und des Konzentrationsbereiches der Wirkstoffe des EDP – M Schemas	67
5.5.2 Kombinationsbehandlung von HSP90 Inhibitoren mit Bestandteilen des EDP – M Schemas	69
5.6 EINFLUSS DER HSP90 INHIBITOREN AUF ZELLULARE SIGNALKASKADEN	74
5.7 EFFEKTE EINER HSP90 INHIBITION AUF DIE STEROIDBIOSYNTHESE	76
6. DISKUSSION	77
6.1 EXPRESSION VON HSP90 UND GR IN NNRK ZELLINIEN	77
6.2 ANTI – TUMORALE EFFEKTE DER VERWENDETEN N – TERMINALEN HSP90 INHIBITOREN IN ZWEI NNRK ZELLINIEN	78
6.3 BEEINFLUSSUNG VON TUMORSIGNALKASKADEN DURCH HSP90 INHIBITOREN	84
6.4 MODULATION DER KORTISOLSEKRETION DURCH HSP90 INHIBITION	86
6.5 AUSBLICK	88
7. ZUSAMMENFASSUNG	92
8. ABKÜRZUNGEN	94

9. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	100
10. TABELLENVERZEICHNIS	102
11. PUBLIKATIONEN UND PRÄSENTATIONEN.....	103
12. DANKSAGUNG	105
13. KURZLEBENSLAUF	107
14. LITERATURVERZEICHNIS	108

1. Einleitung

1.1 Die Nebennieren und das Nebennierenrindenkarzinom

1.1.1 Physiologischer Aufbau und Funktion der Nebennieren

Die Nebennieren sind pyramidenförmige, endokrine Drüsen, deren Hormone essentiell für das Überleben des Organismus sind. Jeder Mensch besitzt zwei Nebennieren, welche sich direkt auf den oberen Nierenpolen befinden, von denen sie mittels Fettgewebe voneinander getrennt sind.

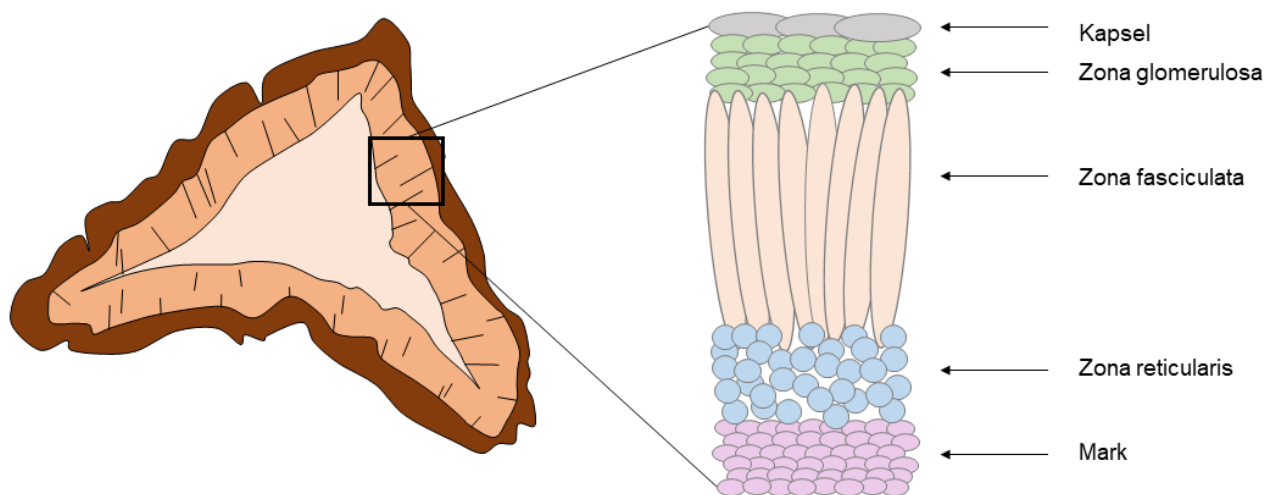


Abbildung 1: Die Nebenniere

Schematische Darstellung der Nebenniere (links) mit Nebennierenrinde und Nebennierenmark sowie die vergrößerte Darstellung der einzelnen Abschnitte der Nebennierenrinde (rechts).

Bei Gesunden sind die Nebennieren ca. 5 cm lang und 3 cm breit, verfügen über eine ausgeprägte Gefäßversorgung und werden über hormonelle Einflüsse sowie das vegetative Nervensystem stimuliert. Mikroskopisch kann man die Nebenniere in die Nebennierenrinde (NNR) und das Nebennierenmark (NNM) unterteilen (*Abbildung 1*). Die Nebennierenrinde wird weiter in drei Zonen mit jeweils unterschiedlichen physiologischen Aufgaben histologisch untergliedert (*Abbildung 1*): Die äußere Zone ist die *Zona glomerulosa*, welche unter anderem verantwortlich für die Bildung der Mineralokortikoide ist. Diese gehören zu den Steroidhormonen und sind vor

allem für den Wasser- und Salzhaushalt und demzufolge auch für die Regulation des Blutdrucks zuständig. Die mittlere Zone ist die *Zona fasciculata*. Sie ist maßgeblich an der Produktion der Glukokortikoide beteiligt. Diese spielen bei mehreren Stoffwechselprozessen eine wichtige Rolle, wie zum Beispiel bei der Regulation des Blutzuckers oder bei der Modulation des Immunsystems. Androgene werden hauptsächlich in der *Zona reticularis* gebildet, welche der inneren Zone der Nebennierenrinde entspricht. Diese sind an der Sexualentwicklung des Organismus mit beteiligt. Jedes einzelne dieser Hormone ist essentiell für die korrekte Regulation vieler Stoffwechselvorgänge im Körper. Daher hat eine Erkrankung der Nebennierenrinde weitreichende Folgen für das Individuum [1-3].

1.1.2 Pathophysiologie der Nebennierenrinde

Die Krankheitsbilder der Nebennieren sind sehr vielseitig. Sie können direkt mit der NNR im Zusammenhang stehen oder auch das Hypothalamus – Hypophysen System beziehungsweise das Renin – Angiotensin – Aldosteron System betreffen.

Die primäre Nebennierenrindeninsuffizienz wird als Morbus Addison bezeichnet und ist bei über der Hälfte der Fälle auf eine Autoimmunreaktion gegen Bestandteile der Nebennierenrinde zurückzuführen. Durch den autoimmun – bedingten Aldosteron – und Kortisolmangel kommt es zu schwerwiegenden Störungen des Stoffwechsels (Hypotonie, Herzrhythmusstörungen, Tachykardien etc.), welche bis zur Addison Krise und zum Tod der Patienten führen können [4]. Die sekundäre Nebennierenrindeninsuffizienz ist durch einen Ausfall des hypophysären Corticotropins (ACTH) gekennzeichnet. Dadurch kommt es vor allem zu einem Kortisolmangel (Hypocortisolismus). Ein isolierter Aldosteronmangel (Hypoaldosteronismus) ist sehr selten und kann zum einen an einer Störung bei der Aldosteronsynthese liegen (primär) und zum anderen durch Defekte bei der Reninfreisetzung – oder bildung verursacht werden (sekundär) [5].

Eine inadäquate hohe Sekretion von Aldosteron beim primären Hyperaldosteronismus (Conn – Syndrom) ist zum Großteil auf ein aldosteron – produzierendes Nebennierenrindenadenom zurückzuführen und hat eine Hypokaliämie sowie ein Hypervolämie zur Folge [6, 7]. Beim sekundären Hyperaldosteronismus kommt es zu einer Störung des Renin – Angiotensin – Aldosteron Systems und dadurch zu einer gesteigerten Aldosteronfreisetzung [8]. Zugrundeliegende Ursachen sind unter anderem chronische Nierenerkrankungen. Das Adrenogenitale Syndrom ist eine Störung der Steroidsynthese, welche am häufigsten auf einen Enzymdefekt der 21 – Hydroxylase beruht [9]. Dieser kann angeboren

(autosomal – rezessiv) oder erworben (z. B.: durch Tumorerkrankungen) sein. Beim primären Hyperkortisolismus handelt es sich um eine Erhöhung der Kortisolkonzentration im Blut. Diese kann ACTH – unabhängig (als adrenales Cushing Syndrom) bei Nebennierenrindenkarzinomen oder – adenomen auftreten [10]. Beim ACTH – abhängigem Hyperkortisolismus (Morbus Cushing) steht vor allem ein ACTH – produzierendes Hypophysenadenom als Ursache im Vordergrund [11]. Der vorliegenden Arbeit liegt das Krankheitsbild des Nebennierenrindenkarzinoms, welches zu einem Hyperkortisolismus führen kann, zugrunde [12, 13].

1.1.3 Nebennierenrindenkarzinom (NNRK)

Das Nebennierenrindenkarzinom (*Abbildung 2*) ist mit einer Inzidenz von 0,5 / 0,7 – 2 Fälle / 1 Mio. Einwohner / Jahr eine seltene, jedoch hoch maligne Erkrankung [14-16]. Die Diagnose erfolgt meistens in einem fortgeschrittenen Erkrankungsstadium, da diese Erkrankung zuerst oft asymptomatisch mit unspezifischen abdominalen Beschwerden verläuft. Eine frühere Diagnose kann erfolgen, wenn die Patienten die Anzeichen eines Steroidhormonexzesses zeigen und somit die Symptomatik des Cushing Syndroms aufweisen [17].

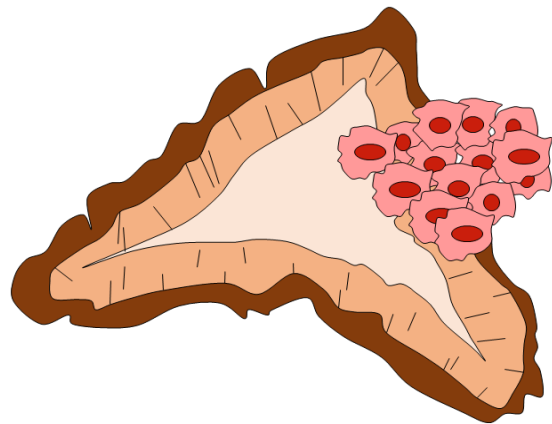


Abbildung 2: Das Nebennierenrindenkarzinom

Schematische Darstellung eines Nebennierenrindenkarzinoms

Nebennierenkarzinome haben bezogen auf das Alter eine bimodale Häufigkeitsverteilung. Sie treten vor allem in der ersten und dann wieder vermehrt ab der fünften Lebensdekade auf. Des Weiteren ist die Erkrankung bei Frauen etwas häufiger anzutreffen als bei Männer (1,5 : 1) [14, 16]. Der Großteil aller Nebennierenrindenkarzinome tritt sporadisch auf und die Pathogenese des NNRK ist bis heute nicht vollständig verstanden. NNRK Patienten weisen somatische Mutationen im TP53 Gen auf, welches zu einer veränderten Funktion des Tumor – Suppressionsproteins p53 führt. Eine Keimbahnmutation des TP53 Gens (Li-Fraumeni Syndrom) wurde vor allem bei Patienten beobachtet, die im frühen Lebensalter bereits ein NNRK entwickelt hatten [18, 19]. Darüber hinaus konnten somatische Mutationen des TP53 Gens auch bei NNRK Patienten im erwachsenen Alter beobachtet werden [20, 21]. Zusätzlich wurde eine Mutation des β – Catenins

beschrieben, welche eine Modulation des für die Tumorentstehung wichtigen Wnt – β - Catenin Signalweges zur Folge hatte [14, 16, 22, 23]. Weiterhin konnten in 90% der NNRK eine Überexpression des IGF – 2 detektiert werden [16, 24, 25]. In der Literatur ist zusätzlich beschrieben worden, dass der Hepatozyten Wachstumsfaktor (HGF) positiv mit dem Wachstum von NNRK Zellen korrelierte und höher im NNRK als im Nebennierenrindenadenom bzw. in der gesunden NNR exprimiert war [26]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der MAPK / ERK Signalkaskadeweg sowie der AKT / mTOR Signalweg einen Einfluss auf die Tumorentstehung und Tumorprogression der Nebenniere hatten [27-29]. Trotz dieser wichtigen Untersuchungen und Charakterisierungen der Pathologie des NNRK sind bis heute keine zusätzlichen Therapieoptionen bei fortgeschrittenem, inoperablem NNRK im klinischen Gebrauch.

Klinisch ist das NNRK in 50% der Fälle mit einem Cushing Syndrom assoziiert. Die Patienten haben neben der Tumorerkrankung auch schwer kontrollierbare Stoffwechselentgleisungen, welche zusätzlich zum Tumor therapiert werden müssen [30]. Die Behandlungsmöglichkeiten des NNRK sind nach aktuellem Wissenstand nicht zufriedenstellend. Nach vollständiger chirurgischer Resektion des Tumors sind die besten Heilungschancen für die Patienten zu verzeichnen. Die Operation sollte aber in ausgewählten Zentren stattfinden, in denen mehr als 10, besser 20, Resektionen von Nebennierentumoren pro Jahr durchgeführt werden. Des Weiteren ist eine Tumorsektion nur möglich, solange noch keine Metastasierung erfolgte. Jedoch sind zum Zeitpunkt der Erstdiagnose nahezu bei einem Drittel der Patienten bereits Metastasen in den umliegenden Gewebe (Lymphknoten, Lunge, Leber) vorhanden [14-16] und es kommt trotz vermeintlich kompletter chirurgischen Resektion des Tumors in vielen Fällen zum Rezidiv. Daher wird eine adjuvante Therapie mittels der adrenolytischen Substanz Mitotane [31] oder Tumorbettbestrahlung vor allem bei Risikopatienten empfohlen. Durch bildgebende Untersuchungen wird ein NNRK nach Krankheitsstadium laut ENSAT (ENSAT Stadium I – IV) untergliedert und nachfolgende Schritte, bezüglich präoperativer Hormondiagnostik, Operation beziehungsweise Chemotherapie / Radiotherapie, eingeleitet. Die Differentialdiagnose Phäochromozytom muss vor Beginn der OP ausgeschlossen werden, da es eine andere OP – Vorbereitung als diejenige für das NNRK bedarf [16].

Nach Entfernung des Tumors wird dieser histologisch untersucht und die NNR – Herkunft mittels SF – 1 (Steroidigenic Factor 1) Färbung gesichert [32]. Die Klassifikation bezüglich der Malignität erfolgt durch den Weiss Score [33, 34], wobei bereits die Tumorgroße ein wichtiger Marker für die Malignität eines Tumors ist [35]. Zusätzlich wird, neben dem Alter, der Mitoserate und dem Glukokortikoidexzess, auch der Proliferationsmarker Ki67 zu der

Klassifizierungsuntersuchung und als Prognoseparameter mit herangezogen [16]. Wie bereits erwähnt, kommt es trotz vermeintlich vollständiger Resektion des Tumors vermehrt zu einem Rezidiv [16, 36]. Die 5 – Jahres – Überlebensrate beträgt bei fortgeschrittenem, inoperablem und metastasierendem NNRK weniger als 15% [37]. Die Tumorgroße und eine hohe Mitoserate sind mit einer schlechten Prognose assoziiert und somit auch mit schlechten Heilungschancen [16].

Der aktuelle Goldstandard zur Behandlung des NNRK ist eine vierfache Kombination aus drei Chemotherapeutika und einer adrenolytische Substanz: Etoposid [E], Doxorubicin [D], Cisplatin [P] und Mitotane [M] (EDP – M). Diese Kombination zeigte eine bessere Ansprechrate und ein langsames Fortschreiten der Erkrankung im Vergleich zu einer Therapie mit Streptozotocin und Mitotane [37]. Jedoch gab es keinen Vorteil bezüglich der generellen Überlebensrate der Patienten und die Ansprechrate innerhalb der mit EDP – M therapierten Patienten war weiterhin uneinheitlich [37, 38]. Daher sind die aktuellen Behandlungsoptionen nicht optimal; weitere Therapiemöglichkeiten werden für den klinischen Alltag benötigt. Aktuell gibt es nur wenige klinische Studien in denen monoklonale Antikörper (beispielsweise Nivolumab, Pembrolizumab) getestet wurden [39, 40]. Diese antagonisieren als Checkpoint Inhibitoren die hemmende Wirkung des Immunsystems. Dadurch kommt es zu einer Sensibilisierung des Immunsystems gegenüber dem Tumor [41]. Jedoch war die Wirkungseffizienz bei Nivolumab moderat und die Patientenkohorte in der Pembrolizumab – Studie war sehr gering, um fundierte Aussagen treffen zu können [39, 42]. Darüber hinaus gibt es zurzeit weitere Studien, welche den Tyrosinkinase Inhibitor Cabozantinib beim NNRK untersuchen [43] ¹.

Aufgrund der Heterogenität und der Seltenheit des Nebennierenrindenkarzinoms sind präklinische Untersuchungsmodelle für weitere Therapieoptionen kaum vorhanden [44, 45]. Neben einer murinen Zelllinie (Y1) für *in vitro* / *in vivo* Versuche [46-49] waren zu Beginn dieser Arbeit noch vier weitere Modelle vorhanden. Zum einen existiert ein pädiatrisches Implantationsmodell, SJ – ACC3 [50] und die SW – 13 Zelllinie. Letztere wurde aus einem kleinzelligen Karzinom von der Nebennierenrinde gewonnen. Jedoch ist der adrenale Ursprung der SW – 13 Zelllinie anzweifelbar und sie kann zusätzlich keine Steroidsekretion vorweisen [51], wodurch Analysen bezüglich des Steroidprofils ausgeschlossen sind. In der vorliegenden Arbeit habe ich mit der hormonaktiven NCI – H295R Zelllinie [30, 52] und mit der in unserer Forschungsgruppe etablierten MUC – 1 Zelllinie gearbeitet [44]. Jüngste Forschungsergebnisse beschreiben die Etablierung von

¹<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=Adrenocortical+Carcinoma&term=cabozantinib&cntry=&state=&city=&dist=>

zwei weiteren Zelllinien, die für zukünftige präklinische Untersuchung des NNRK verwendet werden können [53].

1.2 Heat Shock Protein 90 (HSP90) und seine Inhibitoren

1.2.1 Schematischer Aufbau und Funktionen des HSP90 Moleküls

Heat Shock Proteine (HSP) gehören zu einer großen Familie von evolutionär essentiellen Proteinen, die den Organismus vor Stressfaktoren, beispielsweise Hitze, UV – Strahlung, Hypoxie etc, schützen. Im Allgemeinen verhelfen HSP falsch gefalteten Proteinen beziehungsweise Proteinaggregaten unter ATP Verbrauch funktionsfähige Proteinstrukturen zu bilden und spielen somit eine wichtige Rolle in verschiedensten zellulären Prozessen [54]. Innerhalb der HSP Familie stellte sich die HSP90 Gruppe bei Fehlregulierung als eine entscheidende Gruppe für das Überleben von Tumorzellen dar [55]. Die HSP90 Familie besteht aus fünf Mitgliedern, die durch die Gene HSPC 1 – 5 kodiert werden [56] und deren Genexpressionen hauptsächlich durch den Transkriptionsfaktor HSF – 1 generiert werden [57, 58]. Nachdem der Organismus diversen Stressoren ausgesetzt war, wird HSF – 1 phosphoryliert sowie trimerisiert, bindet an die DNA an sogenannten „heat shock elements“ (HSE) und leitet somit unter anderen die Transkription von HSP90 ein [59, 60].

HSP90 ist hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert, wobei sich ein geringer

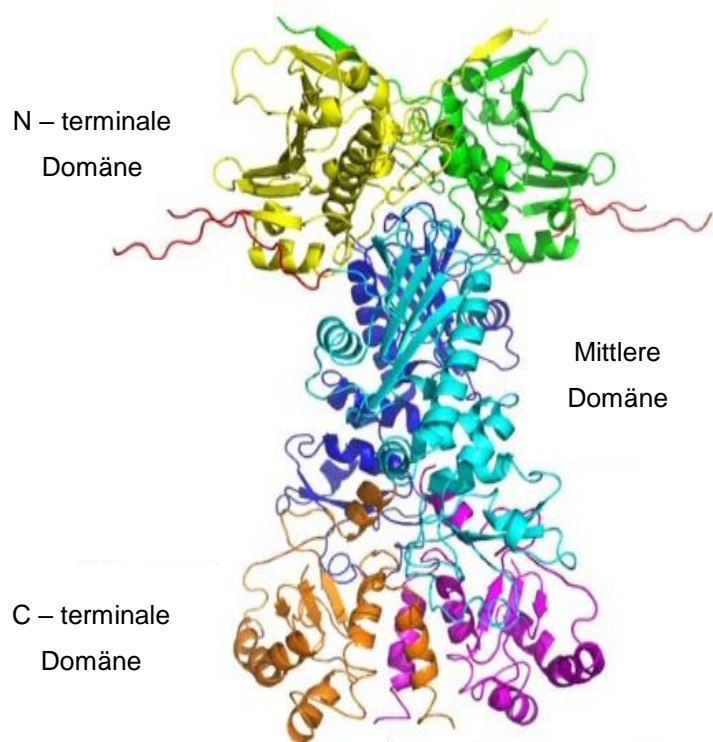


Abbildung 3: Schematische Darstellung des HSP90 Moleküls

Dargestellt ist der geschlossene Zustand des HSP90 Moleküls mit den drei wesentlichen Domänen; die N – terminale, die Mittlere und die C – terminale Domäne. (Abbildung nach Prodromou, 2016)

Prozentsatz von 5 – 10% im Nukleus befindet. Im Zytoplasma macht es 1 – 2% des Proteinanteils aus und ist vor allem für die Stabilisierung der entsprechenden Client Proteine zuständig. Dagegen dient HSP90 im Zellkern vor allem den Transport von Hormonrezeptoren und Proteinkinasen zwischen Zytoplasma und Zellkern [61, 62]. Mit HSP90 α und HSP90 β existieren zwei Hauptisoformen des HSP90 [63]. Dabei ist HSP90 α die induzierbare Isoform, deren Bildung durch Stresssensoren aktiviert wird. Darüber hinaus war eine Überexpression von HSP90 α in verschiedensten Tumorzellen, beispielsweise in Brustkrebs und Pankreaskarzinom sowie in Leukämiezellen, vorzufinden [63-66]. Dieses spiegelt wiederum die Möglichkeit wider HSP90 als potentiell Target in der Tumorthapie anzusehen. Im Gegensatz dazu ist HSP90 β konstitutiv vorhanden, kann aber auch unter Stresseinfluss hochreguliert werden [63, 64]. Neben dem, vor allem im Zytoplasma lokalisierten, HSP90 α und HSP90 β gibt es noch weitere Mitglieder der HSP90 Familie, welche zum einen in der mitochondrialen Matrix (TRAP1) und zum anderen im endoplasmatischen Retikulum (GRP94) lokalisiert sind [61, 63].

Der HSP90 Chaperon – Komplex liegt vor allem als Homodimer vor und untergliedert sich in drei Domänen, welche sich funktionell voneinander unterscheiden. Die Amino – terminale Domäne (NTD) ist die wesentliche Bindungsstelle von ATP und ist daher der Hauptakteur für die Konformationsänderung des Komplexes und somit auch mitverantwortlich für die korrekte Faltung der sogenannten Client Proteine [67]. Die Funktion der mittleren Domäne (MD) ist noch nicht vollständig erforscht. Anhand der bisherigen Erkenntnisse ist darauf zu schließen, dass die MD für die Vermittlung beziehungsweise die Kommunikation zwischen NTD und CTD sowie für die Interaktion mit Client Proteinen zuständig ist [68-70]. Die Carboxy – terminale Domäne (CTD) erkennt Co – Chaperone, assistiert sowie reguliert die HSP90 Aktivität und vermittelt die Dimerisierung des Komplexes. Die CTD bindet auch energieliefernde Nukleotide beziehungsweise sie verfestigt bereits bestehende Bindungen [71, 72] (*Abbildung 3*).

Während des Chaperon Zyklus binden Proteinstrukturen, die durch äußere Faktoren, wie zum Beispiel Hitze, UV – Strahlung, mutagene Stoffe etc., eine falsche Struktur aufweisen beziehungsweise Proteine, die noch nicht vollständig synthetisiert wurden und daher falsch gefaltet vorliegen, an den HSP70 / HSP40 / ADP Komplex und an HIP („HSP70 interacting protein“). Zu Beginn eines jeden Chaperon Zyklus befinden sich die HSP90 Moleküle in einer offenen, inaktiven Form. HSP90 bindet dann das entsprechende Client Protein (falsch gefaltete Proteine) zusammen mit dem Co – Chaperon / HIP – Komplex unter der Dissoziation von ADP. Zusätzlich bindet auch ein Adapterprotein HOP („HSP90 – HSP70 organizing protein“). Daraufhin binden weitere Co – Chaperone (beispielsweise FKBP51, FKBP52) und ATP. HSP70, HIP und

HOP dissoziieren wieder vom Heterokomplex und durch ATP Hydrolyse ändert sich die HSP90 Konformation von der offenen in die geschlossene, aktive Form. Die Client Proteine des HSP90 erreichen ihre korrekte Struktur und können somit ihre zellulären Funktionen ausüben. Nach ATP – Hydrolyse geht HSP90 wieder in die offene Form über und der Chaperon Zyklus kann erneut beginnen [72-74] (Abbildung 4).

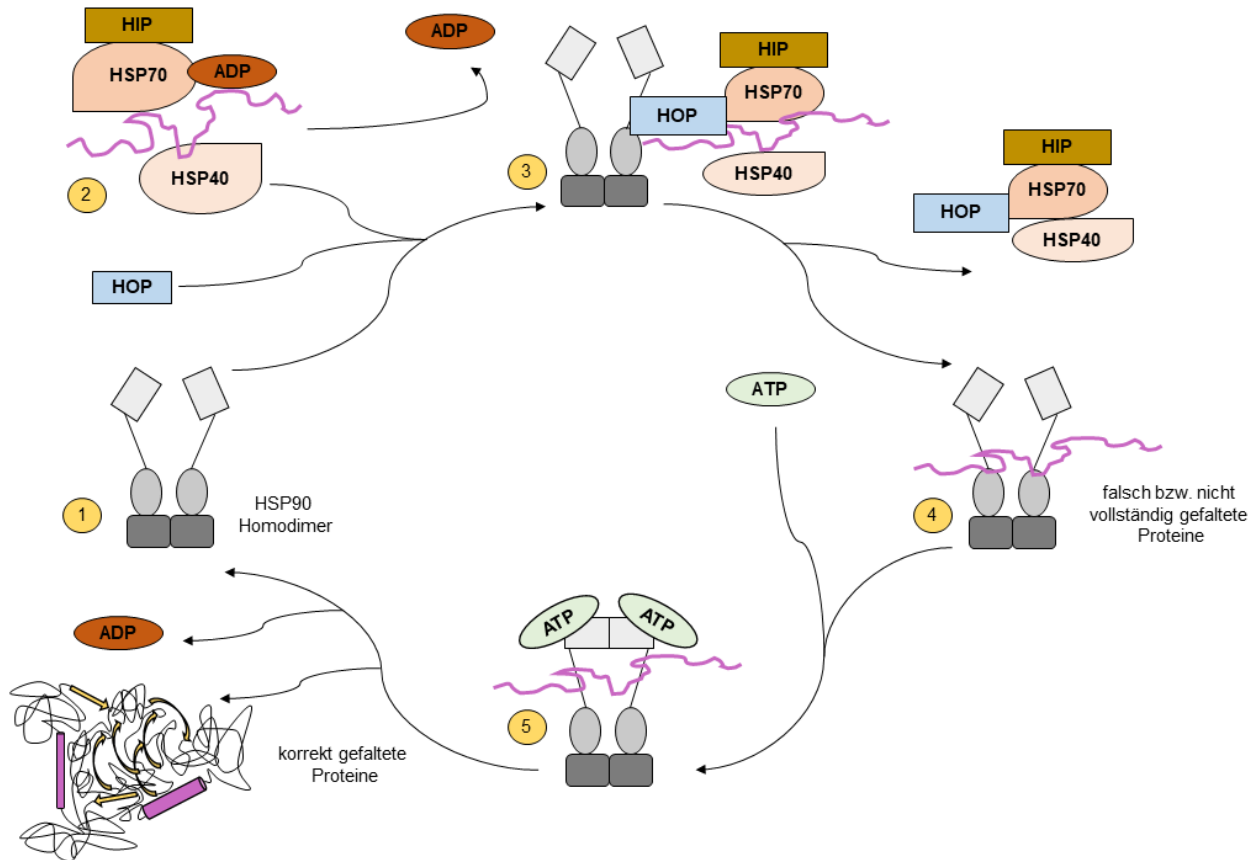


Abbildung 4: HSP90 Chaperon – Zyklus

Dargestellt wird die Bindung vom HSP90 Homodimer an den HSP40 / HIP / HSP70 / ADP-Komplex. Der HSP70 / HSP40 / HIP / ADP – Komplex hat nicht korrekt gefaltete Proteine gebunden, welche innerhalb des Chaperon – Zyklus die richtige Struktur erhalten (1), (2). Das falsch gefaltete Protein wird, nachdem ein Adapterprotein HOP an den HSP70 / HSP40 / HIP / ADP – Komplex gebunden hat, auf HSP90 übertragen. Daraufhin dissoziiert der HSP70 / HSP40 / HIP / ADP – Komplex vom HSP90 Molekül (3), (4). Es erfolgt unter ATP – Verbrauch eine Konformationsänderung von HSP90 und die Client Proteine des HSP90 erlangen die korrekte Struktur und können ihre Funktionen ausüben (5). (Abbildung modifiziert und vereinfacht nach Hoter et al., 2018)

1.2.2 Die Rolle von HSP90 bei Tumorerkrankungen

Im gesunden Gewebe sorgen Heat Shock Proteine für den Schutz der Zellen vor Stress. Zusätzlich sind HSP bei der Stabilisierung onkogener Proteine involviert und sorgen damit für ein besseres Überleben beziehungsweise Fortschreiten von Tumoren [56, 75]. Es hat sich herausgestellt, dass HSP90 einen besonderen Stellenwert unter den molekularen Chaperonen einnimmt, da es für die Funktion vielfacher Proteine, welche auch zur Tumorentstehung beitragen können, verantwortlich ist. Proteine, die durch HSP90 ihre korrekte Struktur bekommen, sind global vertreten und in essentiellen Stoffwechselvorgängen integriert. Zu diesen Client Proteinen gehören unter anderen Kinasen, Transkriptionsfaktoren, p53 etc., welche bei Überexpression und / oder Fehlfunktionen zu Erkrankungen führen können [75, 76]. Es konnte gezeigt werden, dass HSP90 1 – 2% des zytoplasmatischen Proteinanteils von gesunden Zellen ausmacht und dass es zu einer 2 – 10 fach erhöhten Expression von HSP90 in verschiedensten Tumorgeweben kommt [61, 76]. Somit sind Tumorzellen stärker als gesunde Zellen von der Chaperon Funktion des Heat Shock Proteins 90 abhängig. Schlussfolgernd kann HSP90 als potentielles Target in der Krebstherapie angesehen werden [56]. Dabei ist nicht nur die erhöhte Expression von HSP90 im Tumorgewebe entscheidend, sondern auch dessen Funktion bezüglich Tumorstadium oder Tumorentstehung [76-78]. Ein Grund für die höhere Expression von HSP90 ist ein ungünstiges Microenvironment im Tumorgewebe und die dadurch verbundenen Anpassungsmechanismen, die für das Tumorüberleben notwendig sind. Unter diesen Stresskonditionen im Tumor kommt es zu einer gesteigerten Expression des HSF – 1 , welcher als primärer Transkriptionsfaktor die Transkription von HSP Genen steuert und damit deren Genexpression und Translation steigert („heat shock response“) [58, 79]. Somit kommt es zu einer Stabilisierung von aktivierten onkogenen Proteinen (Client Proteinen des HSP90 Moleküls) in den entsprechenden Tumorzellen [75, 76]. Diese spielen wiederum in vielfachen zellulären onkogenen Prozessen, wie beispielsweise bei der Verhinderung von wachstumshemmenden Signalen, der Umgehung von Apoptose, der nicht regulierten Zellteilung, der Vermeidung von Zell – Seneszenz, der Angiogenese und der Zellinvasion sowie der Metastasierung, eine Rolle [75, 80]. Ein krankheitsspezifisches HSP90 Client Protein des NNRK ist der Glukokortikoidrezeptor (GR), welcher eine potentielle Zielstruktur zur Behandlung des Cushing Syndroms darstellt und somit bei der Therapie mittels HSP90 Inhibitoren eine Rolle spielen kann [81]. Des Weiteren wurde eine Interaktion des GR mit der C – terminalen Domäne des HSP90 Moleküls beschrieben [82] und eine Verbesserung der Morbus Cushing Symptomatik konnte bereits durch C – terminale HSP90 Inhibitoren gezeigt werden. Durch die Therapie mit

C – terminalen HSP90 Inhibitoren wird die Bindung zwischen GR und HSP90 unterbrochen und dadurch liegt der GR wieder in freier Form vor [83]. In einem weiteren Beispiel konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass eine HSP90 Inhibition zur Degradierung des GR führte und somit sich ein therapeutischer Vorteil bei der Kombination mit Paclitaxel zur Behandlung des dreifach negativen Brustkrebses herausstellte [84].

1.2.3 HSP90 Inhibitoren

Aufgrund der Struktur des HSP90 Moleküls existieren N – terminale und C – terminale HSP90 Inhibitoren sowie Wirkstoffe, die an der mittleren Domäne des HSP90 Moleküls angreifen können. Daher existieren sehr viele HSP90 Inhibitoren unterschiedlichster Strukturklassen für präklinische und klinische Studien. *Tabelle 1* stellt eine Übersicht von HSP90 Inhibitoren dar [56, 77, 85-92]. Die tabellarische Zusammenfassung (*Tabelle 1*) ist hierbei nicht vollständig und fokussiert sich in der weiteren Beschreibung zudem auf die in dieser Arbeit verwendeten HSP90 Inhibitoren.

HSP90 Inhibitoren sind bereits in einer Reihe von Tumorarten in präklinischen und klinischen Studien involviert und zeigten vielversprechende Wirkungen [93]. Der Durchbruch der HSP90 Inhibitoren gelang mit den Naturprodukten Geldanamycin [94, 95] und Radicicol [56, 95-97]. Beide Verbindungen interagieren mit der N – terminalen Domäne des HSP90 Moleküls, indem sie die ATP – Bindung kompetitiv blockieren und somit die ATP – Hydrolyse hemmen. Woraufhin konsequenterweise onkogene Client Proteine des HSP90 Moleküls degradiert werden [85, 98-100]. Jedoch zeigte Geldanamycin eine schlechte Löslichkeit und unter anderen akute Lebertoxizität [101, 102]. Daraufhin wurden Analoga von Geldanamycin synthetisiert, um die Bioverfügbarkeit sowie das Nebenwirkungsprofil zu verbessern [56]. Zu diesen gehören unter anderen 17 – Dimethylamino – Geldanamycin (17 – DMAG) und 17 – AAG (17 – Allylamino – 17 – Dimethoxy – Geldanamycin, auch Tanespimycin genannt) [103-106], welches bereits in klinischen Studien eingesetzt wird² [107-110]. Der Therapieerfolg war trotz der besseren Verträglichkeit verglichen mit Geldanamycin [103, 105], aufgrund der weiter vorhandenen begrenzten Löslichkeit vor allem von 17 – AAG und wegen des Nebenwirkungsprofils, beschränkt [109, 111].

² <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=17-AAG&cntry=&state=&city=&dist=>

Durch konsequente Optimierung der HSP90 Inhibitoren existieren heutzutage klein – molekulare, hoch wirksame HSP90 Inhibitoren der zweiten Generation mit einem verbesserten pharmakodynamischen und pharmakokinetischen Wirkungsprofil (*Tabelle 1*). Die in dieser Arbeit verwendeten N – terminalen HSP90 Inhibitoren, Luminespib und Ganetespib, zeigten eine geringere Lebertoxizität, unter anderem aufgrund des Fehlens der Benzochinon Struktur [112, 113] und werden bereits in klinischen Studien eingesetzt. So zeigte beispielsweise Luminespib präklinische Wirkerfolge bei der Behandlung von Bauchspeicheldrüsenkrebs, Gallengangskarzinom, erwachsenen T – Zell – Leukämie – Lymphom und in weiteren humanen Tumorzelllinien [112, 114-116]. Die präklinische als auch klinische anti – tumorale Wirkung von Ganetespib wurde exemplarisch in Leberkrebs, nicht – kleinzelligem Lungenkrebs und in Brustkrebs gezeigt [117-120].

Aufgrund der durch N – terminale HSP90 Inhibitoren hervorgerufene „heat shock response“ kam es zu Resistenzentwicklung gegenüber den N – terminalen HSP90 Inhibitoren und somit zu einer schlechteren Wirkeffizienz [121, 122]. Diese drückte sich durch eine gesteigerte Synthese vor allem von HSF – 1 aus, welche somit zur vermehrten Transkription von HSP90 und anderen Heat Shock Proteinen beitrug und das Überleben des Tumors unter HSP90 Inhibitor Therapie sicherte [58, 79, 123]. Beispielsweise wird HSP70 durch HSP90 Inhibition hochreguliert [124-126], welches sogar als Nachweis einer erfolgreichen HSP90 Inhibition dient. Des Weiteren können auch durch P – Glykoproteinen (MDR) Resistenzen gegenüber einer HSP90 Inhibitor Therapie der älteren Generation auftreten [125, 127]. Eine direkte Unterdrückung der „heat shock response“ mittels „knock out“ des HIF – 1 führte in vitro zu Therapieerfolgen zusammen mit einer HSP90 Inhibition [57]. Aufgrund von diesen Resistenzmechanismen, welche vor allem nach Behandlungen mit N – terminalen HSP90 Inhibitoren sichtbar wurden, war es notwendig weitere Targetstrukturen am HSP90 Molekül zu identifizieren. Somit wurde die C – terminale Domäne des HSP90 Moleküls als weitere Zielstruktur für Wirkstoffe erkannt und C – terminale HSP90 Inhibitoren wurden entwickelt. Diese HSP90 Inhibitoren zeigten die zuvor beschriebene „heat shock response“ nicht [122, 128]. Um die Wirkungsweise dieser Inhibitoren im NNRK abzuklären, wurden in dieser Arbeit zwei weitere C – terminale HSP90 Inhibitoren, Novobiocin und Silibinin, als Vergleichswirkstoffe zu den N – terminalen HSP90 Inhibitoren eingesetzt. So konnten bereits das Aminocumarin Antibiotikum, Novobiocin [129-132], und ein Stoff, welcher in der Mariendistel vorkommt, Silibinin, apoptotische Effekte in Tumorzellen zeigen [133]. Im Besonderen konnte Silibinin bei der Behandlung des Morbus Cushing, bei Blasenkrebs und beim kolorektalem Karzinom präklinische als auch klinische Behandlungserfolge in Einzel – und Kombinationstherapie aufweisen [83, 134,

135]. Des Weiteren präsentierte Silibinin ein gutes Nutzen – Risiko – Verhältnis vor allem bei der therapeutischen Anwendung in Lebererkrankungen [136, 137].

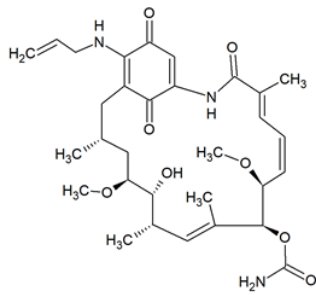
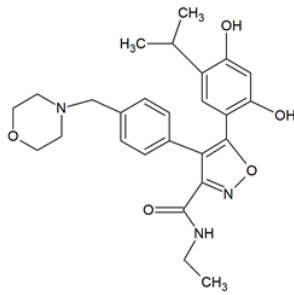
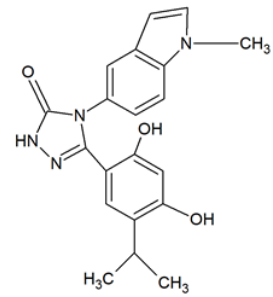
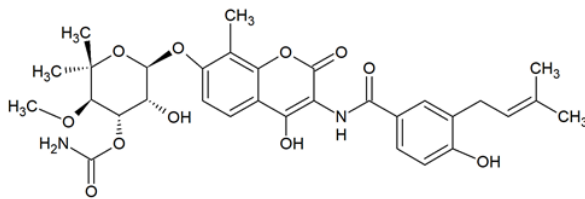
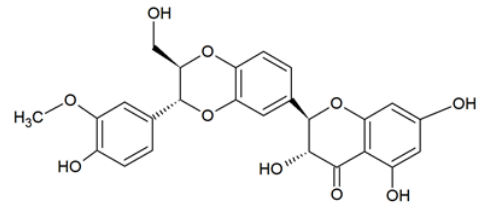
Neben Luminespib und Ganetespib als Vertreter der jüngeren Generation an HSP90 Inhibitoren wurde 17 – AAG als Vertreter der N – terminalen HSP90 Inhibitoren der früheren Generation in den hier durchgeführten Experimenten mit aufgenommen. Dieser wurde im Laufe der Arbeit aber als Behandlungsoption nicht weiter verfolgt, da Luminespib und Ganetespib eine deutlich bessere Wirkung bei der Behandlung von NNRK Zelllinien zeigten. Darüber hinaus war bereits für andere Tumore bekannt, dass das Nebenwirkungsprofil und die Bioverfügbarkeit von 17 – AAG negativer ausfallen würde und somit dieser Wirkstoff für zukünftige Studien nicht in Frage käme [100, 109, 111].

Aufgrund der geringen Behandlungsmöglichkeiten von NNRK Patienten sind weitere Forschungsbemühungen zu neuen Zielstrukturen notwendig. Zhang et al konnte bereits zeigen, dass eine HSP90 Inhibition präklinische Therapieerfolge in multiresistenten Tumoren zeigte [127]. Bei der Kombination von BIIB021 und CCT18159 mit Mitotane zur Behandlung des NNRK sah man jedoch keine synergistischen Effekte [138]. Demzufolge sind weitere präklinische Untersuchungen zur Behandlungsoptimierung und zur Widerspiegelung der Heterogenität des NNRK unabdingbar.

<u>Angriffspunkte</u>	<u>Strukturklassen</u>	<u>Beispiele</u>
N – terminale Domäne des HSP90 Moleküls	<ul style="list-style-type: none"> • Geldanamycin • Radicicol • Purine • Pyrazol 	<ul style="list-style-type: none"> • 17 – AAG • 17 – DMAG • IPI – 504 • IPI – 493 • NVP – AUY922 • AT13387 • Ganetespib • KF25706 • KF58333 • KW – 2478 • BIIB021 • Debio 0932 • PU – H71 • MPC – 3100 • CUDC – 305 • CCT018159
Mittlere Domäne des HSP90 Moleküls		<ul style="list-style-type: none"> • Triptolide
C – terminale Domäne des HSP90 Moleküls	<ul style="list-style-type: none"> • Coumarin Antibiotika und Analoga • Cross linker • Pflanzliche Inhaltsstoffe 	<ul style="list-style-type: none"> • Novobiocin • NCT – 50 • Cisplatin • Silibinin

Tabelle 1: Übersicht über HSP90 Inhibitoren

In dieser Arbeit wurden die in *Abbildung 5* dargestellten N – und C – terminalen HSP90 Inhibitoren an zwei Nebennierenrindenkarzinom Zelllinien getestet.

N – terminale HSP90 Inhibitoren**17 – AAG****Luminespib****Ganetespib****C – terminale HSP90 Inhibitoren****Novobiocin****Silibinin****Abbildung 5: HSP90 Inhibitoren**

Diese Abbildung zeigt die in dieser Arbeit verwendeten N – terminalen HSP90 Inhibitoren (17 – AAG, Ganetespib und Luminespib) sowie die verwendeten C – terminalen HSP90 Inhibitoren (Novobiocin und Silibinin).

2. Ziele der Arbeit

Das Nebennierenrindenkarzinom ist eine seltene und sehr heterogene Erkrankung [14-16] mit einem Mangel an präklinischen Untersuchungsmodellen, an denen neue Therapieoptionen getestet werden könnten [44, 45]. In Anbetracht der aktuell nur unbefriedigenden Behandlungsmöglichkeiten gerade für Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung sind weitere therapeutische Optionen erforderlich.

Ziel dieser Arbeit war es, „Heat shock protein 90“ (HSP90) als neues potentiell Target und HSP90 Inhibitoren als neue Therapieoption für das NNRK zu definieren (*Abbildung 6*). Dafür wurden aus einem Pool von HSP90 Inhibitoren nach ausgiebiger Literaturrecherche fünf Wirkstoffe ausgewählt, welche zum einen an der N – terminalen Domäne (17 – AAG, Luminespib und Ganetespib) oder zum anderen an der C – terminalen Domäne

(Silibinin und Novobiocin) des HSP90 Moleküls angreifen. Diese sollten daraufhin auf ihre Wirksamkeit in zwei NNRK Zelllinien getestet werden. Nachdem zu Beginn die Etablierung des Dosisbereichs und Behandlungszeitraums sowie die Wirkung der HSP90 Inhibitoren auf die Zellviabilität der NCI – H295R und MUC – 1 Zellen im Vordergrund standen, sollten im Laufe der Arbeit weitere anti – tumorale Effekte der verwendeten HSP90 Inhibitoren in den zwei NNRK Zelllinien und in NNRK Primärkultur abgeklärt werden. Darüber hinaus sollten die HSP90 Inhibitoren mit Wirkstoffen des EDP – M Schemas kombiniert werden und additive oder synergistische Effekte auf die Zellviabilität sollten bestimmt werden. Zumal bis zu 50% der NNRK Patienten zusätzlich zu der Tumorerkrankung ein Cushing Syndrom mit einem einhergehenden Hyperkortisolismus aufweisen, war eine Abklärung der Auswirkung der HSP90 Inhibitoren auf die Kortisolsekretion als ein weiterer Aspekt unabdingbar. Anhand dieser Versuche sollte eine Auswahl über die HSP90 Inhibitoren getroffen werden, welche am wirksamsten waren und welche

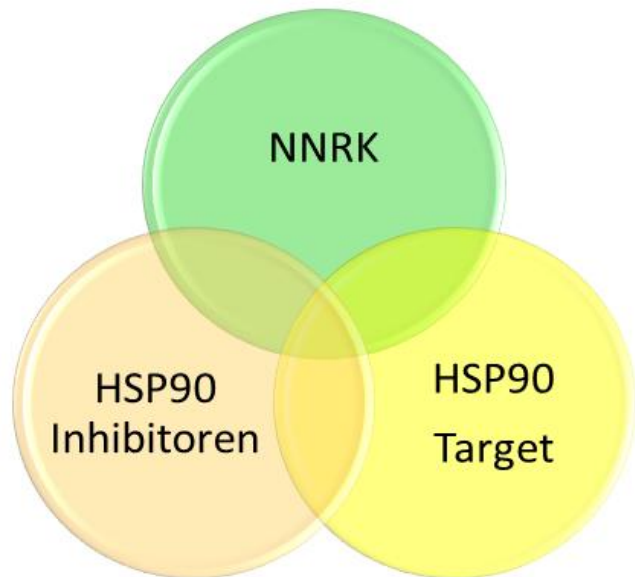


Abbildung 6: Ziele der Arbeit

Die Darstellung zeigt die drei Hauptthemengebiete der Dissertation und die potentiellen Überlagerungen der einzelnen Themen.

für zukünftige Studien verwendet werden könnten. Darüber hinaus sollten in einem Teilprojekt, die Expression sowie die Lokalisierung von HSP90 α und HSP90 β an NNRK Xenograft Gewebeschnitten beziehungsweise in NNRK Zellen ermittelt werden. Nach erfolgreicher *in vitro* Behandlung mit HSP90 Inhibitoren sollten tumorspezifische Signalkaskaden analysiert werden. Wobei solche Signalkaskaden ausgewählt werden sollten, in denen Client Proteine von HSP90 eine wichtige Rolle spielen.

3. Materialien

3.1 Geräte / Equipment

<u>Bezeichnung</u>	<u>Anwendung</u>	<u>Hersteller</u>
Analysenwaage	Einwaage	Kern 770
Chamber slide	Immunfluoreszenz	Sarstedt
ChemiDoc	Entwicklung Western Blots	Biorad
Einbettkassetten	Fixierung / Lagerung von Gewebe	VWR international
Einbettmaschine	Einbetten von Gewebe in Paraffin	Microm EC 350-2
Eismaschine	Kühlung der Proben	Manitowoc
Entwässerungsmaschine (STP 120)	Entwässern von Frischgewebe	Microm
Filter (diverse Porengröße)	Sterilfiltration	Corning
Fluoreszenzmikroskop	Fluoreszenzaufnahmen	Leica DM2500
GLOMAX plate reader	CellTiter Blue Auswertung	Promega
Inkubator (Galaxy 170S)	Kultivierung von MUC – 1 Zellen	New Brunswick
Inkubator (Hera cell 150)	Kultivierung von NCI – H295R Zellen	Heraeus
Insulinspritzen	Homogenisieren	BD – Micro – Fine™
Kamera Fluoreszenzmikroskop	Fluoreszenzaufnahmen	Leica DFC 340FX

Kamera Lichtmikroskop	lichtmikroskopische Aufnahmen von Gewebeschnitten	Leica DMC 2900
Kamera Lichtmikroskop	lichtmikroskopische Aufnahmen von Zellen	Leica EC3
Laminar Flow Bench	Arbeiten unter sterilen Bedingungen	BDK Luft – und Reinraumtechnik
Liaison®	Kortisolmessung	DiaSorin
Lichtmikroskop	lichtmikroskopische Aufnahmen von Gewebeschnitten	Leica DMRB
Lichtmikroskop	Lichtmikroskopische Aufnahmen von Zellen	Leica DMIL LED
Mikroplattenleser	Messung der Viabilität	Tecan
Mikroplattenleser iMark™	Messung der Viabilität	Biorad
Mikroreaktionsgefäße	Bearbeitung der Proben	Eppendorf AG
Mikrotom	Schneiden von Gewebe	Microm HM 335E
Mikrowelle	Erwärmung von Puffern	Daewoo
Parafilm	Lagerung	Bemis
pH – Meter (pH 7110)	Bestimmung und Einstellung des pH – Wertes	ino Lab
Pipetboy (accu jet pro)	Pipettieren	Brand
Pipetten (verschiedene Größen)	Pipettieren	Sarstedt

Plattenschüttler (KS125 basic)	Vermischung des Inhalts von Mikroreaktionsplatten	IKA Labortechnik
Nitrocellulose Membran	Western Blot	Amersham Biosciences
Reaktions – und Zentrifugenröhrchen	Vorbereitung und Durchführung der Experiment	Sarstedt
Rezepturwaage	Einwaage	Kern 440 – 45
Spritzen	Sterilfiltration	BD Discardit TM II
Trockenschrank	Trocknung der Gewebeschnitte	Heraeus instruments
Trockenschrank	Erwärmung von Medien	Memmert
Victor 1420	Messung der Proliferation und Apoptose	PerkinElmer
Vortex Genie 2	Homogenisieren	Scientific industries
Wasserbad	zum Glätten von Gewebeschnitten	Microm SB80
Wasserbad	Erwärmen der Medien für Zellkultur	Memmert
Zellkulturplatten (diverse Formate)	Zellkultur – Assays	Sarstedt
Zellmigrationsinserts	Zellmigrations – Assay	Ibidi
Zellschaber	Ernten der Zellen	Sarstedt
Zentrifuge 5424 R	Labor	Eppendorf
Zentrifuge (Hettich Universal 2S)	Zellkultur	Hettich

Tabelle 2: Verwendetes Equipment

3.2 Chemikalien

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
30% Acrylamid Mix	Merck
17 – Allylamino – 17 – dimethoxygeldanamycin (17 – AAG)	Tocris
Ammoniumchlorid	Merck
Ammoniumpersulfat	AppliChem
Cisplatin	Accord Healthcare
3 - (4,5 – Dimethylthiazol – 2 – yl) 2,5 – diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	Sigma-Aldrich
Doxorubicin	Teva
EDTA (di – Natriumsalz)	Serva
Etoposid	Teva
Ganetespib	Selleckchem
Glycin	Carl Roth
Histoplast (Paraffinplättchen)	Thermo Scientific
Kaliumhydrogencarbonat	Merck
Luminespib	Selleckchem
Magnesiumsulfat x 7 H ₂ O	Carl Roth

Milchpulver	Carl Roth
Mitotane	Merck
Natriumchlorid	Sigma Aldrich
Natriumdesoxycholat	Sigma Aldrich
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Fluka
Natriumzitat	Merck
Novobiocin	Millipore
NP – 40	Sigma Aldrich
Paraformaldehyd	Sigma Aldrich
Silibinin	Sigma-Aldrich
TEMED	Carl Roth
Titriplex II	Merck
Tris base	Sigma Aldrich
Zitronensäure	Carl Roth

Tabelle 3: Eingesetzte Chemikalien

3.3 Kits und Assays

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
Caspase Glo Assay	Promega
Cell Prolifertion ELISA, BrdU (colorimetric)	Roche
CellTiter Blue® Cell Viability Assay	Promega
Dako Kit Real EnVision Detection	Dako
Roti Histokitt II	Carl Roth

Tabelle 4: Verwendete Kits und Assays

3.4 Medien und Reagenzien

Zellkultur

<u>Bezeichnung</u>	<u>Anwendung</u>	<u>Hersteller</u>
advanced DMEM / F12	Grundmedium MUC – 1	Thermo Fisher Scientific
Amphotericin B	Supplement	Biochrome
Charcoal stripped serum	Supplement	Thermo Fisher Scientific
DMEM / F12	Behandlungsmedium	Thermo Fisher Scientific
Fetales Rinderserum (FBS / FCS)	Supplement	Thermo Fisher Scientific

Insulin – Transferrin – Selenium	Supplement	Thermo Fisher Scientific
Kollagenase II	Primärkultur	Biochrome
L – Glutamin	Supplement	Thermo Fisher Scientific
Penicillin / Streptomycin	Supplement	Thermo Fisher Scientific
RPMI 1640 + GlutaMAX	Grundmedium NCI – H295R	Thermo Fisher Scientific
Trypanblau 0,4%	Farbstoff zum Auszählen der Zellen	Thermo Fisher Scientific
Trypsin – EDTA 0,05%	Trypsinieren der Zellen	Thermo Fisher Scientific

Tabelle 5: Verwendete Medien und Reagenzien für Zellkulturexperimente

Labor

<u>Bezeichnung</u>	<u>Anwendung</u>	<u>Hersteller</u>
Bradford Reagenz	Western Blot	Biorad
ECL Substrat	Western Blot	Merck
Humanes Serum	Blockierungspuffer	Biochrome
Mounting medium (Vectashield with DAPI)	Immunfluoreszenz	Vector Laboratories
PhosphoStop	Western Blot	Roche
Protease Inhibitor Cocktail	Western Blot	Sigma
Roti®Load I	Western Blot	Carl Roth

Tabelle 6: Verwendete Medien und Reagenzien für Laborexperimente

3.5 Herstellung von Puffern und Lösungen

Lösungen und Puffer

Ammoniumpersulfat – Lösung

Für eine 10% ige Lösung wurden 10,0 g Ammoniumpersulfat in 100 ml dd H₂O gelöst.

Blockierungspuffer IHC / IF

Dieser hatte 10% Anteil an Tris – HCl / 1% Twenn®20 Lösung und 20% Anteil von humanem Serum. Aufgefüllt auf das gewünschte Gesamtvolumen wurde mittels dd H₂O.

Blockierungspuffer Western Blot

Hierfür wurden 5 g Milchpulver in 100 ml TBS - T Puffer gelöst, damit man eine 5% Milchlösung erhielt.

Differenzierungslösung

Hierfür wurde ein Liter 70% Ethanol mit 2,5 ml konzentrierter Salzsäure (37,5%) versetzt.

Elektrophoresepuffer

Hierfür wurden folgende Ausgangsstoffe verwendet:

3,03 g Tris – Base

14,42 g Glycin

1,0 g SDS

Die Substanzen wurden in 1 L dd H₂O gelöst und im Anschluss wurde der pH – Wert auf 8,3 eingestellt.

Erythrozyten - Lysis Puffer (pH = 7,4)

Die Rezeptur für den Erythrozyten – Lysis Puffer war folgende:

8,30 g Ammoniumchlorid

1,00 g Kaliumhydrogencarbonat

0,30 g Titriplex II

ad 1000 ml Aqua ad injectabilia

Leitungswasserersatzlösung nach Scott (engl.: Scott's tap water substitution)

Hierfür wurden folgende Feststoffe eingewogen:

40,90 g Magnesiumsulfat

3,80 g Natriumhydrogencarbonat

Im Anschluss wurden die Feststoffe in einem Gesamtvolumen von 1 L doppelt destilliertem Wasser aufgelöst.

5 mg / ml MTT Lösung

Hierfür wurde MTT im Milligramm Bereich eingewogen und das entsprechende Volumen an PBS zum Lösen der Substanz hinzugefügt. Im Anschluss wurde die Lösung steril filtriert. Die Arbeitskonzentration lag bei 0,5 mg / ml. Diese Verdünnung wurde mit dem entsprechenden Behandlungsmedium hergestellt.

Natriumdesoxycholat – Lösung

Für eine 0,5% ige Lösung wurden 0,5 g Natriumdesoxycholat in 100 ml dd H₂O gelöst.

Natriumchlorid – Lösung

Hierfür wurde für eine 150 mM Lösung 876,6 mg Natriumchlorid in 100 ml dd H₂O gelöst.

10% Natriumlaurylsulfat Lösung (10% und 0,1% SDS Lösung)

Hierfür wurden 10,0 g beziehungsweise 0,1 g Natriumlaurylsulfat eingewogen und mittels 100 ml dd H₂O gelöst.

NP - 40 Lösung

Für 1% ige Lösung wurden 1,0 g NP – 40 in 100 ml dd H₂O gelöst.

4% Paraformaldehyd (PFA)

Die Arbeiten fanden unter einem Abzug statt. 4 g PFA wurden eingewogen und mit 20 ml dd H₂O vermischt. Die Lösung wurde auf 50°C erwärmt und es wurde tropfenweise NaOH hinzugefügt bis die Lösung klar wurde. Im Anschluss wurde auf 100 ml mit PBS aufgefüllt. Der pH – Wert wurde auf 7,4 eingestellt. Dieser konnte mittels HCl auch nachjustiert werden.

Phosphatgepuffertes Salz (engl.: phosphate buffered saline (PBS))

Hierfür wurde wie folgt vorgegangen:

1 Phosphatgepufferte Salz Tablette (PBS) wurde in 500 ml doppelt destilliertes Wasser gelöst.

RIPA - Puffer

Hierfür wurden folgende Ausgangsstoffe und Konzentrationen benötigt:

50 mM Tris – HCl pH = 8,0

150 mM Natriumchlorid - Lösung

1% NP - 40

0,5% Natriumdesoxycholat

0,1% SDS

Sammelgel

Für 1 ml Gel wurden folgende Mengen benötigt:

0,68 ml dd H₂O

0,17 ml 30% Acrylamid Mix

0,13 ml 1,0 M Tris – HCl (pH = 6,8)

0,01 ml 10% SDS Lösung

0,01 ml 10% Ammoniumpersulfat

0,001 ml TEMED

Transferpuffer

Hierfür wurden folgende Ausgangsstoffe benötigt:

3,03 g Tris – Base

14,42 g Glycin

150 ml MeOH

Zum Schluss wurde auf 1 L dd H₂O aufgefüllt.

Trenngel

Für 5 ml Gel und einer Endkonzentration von 10% wurden folgende Ausgangsstoffe verwendet:

1,9 ml dd H₂O

1,7 ml 30% Acrylamid Mix

1,3 ml 1,5 M Tris – HCl (pH = 8,8)

0,05 ml 10% SDS

0,05 ml 10% Ammoniumpersulfat

0,002 ml TEMED

Für 5 ml Gel und einer Endkonzentration von 12% wurden folgende Ausgangsstoffe verwendet:

1,6 ml dd H₂O
2,0 ml 30% Acrylamid Mix
1,3 ml 1,5 M Tris – HCl (pH = 8,8)
0,05 ml 10% SDS
0,05 ml 10% Ammoniumpersulfat
0,002 ml TEMED

Tris – EDTA (TE) Puffer (pH = 9,0)

Hierfür wurden folgende Feststoffe eingewogen:

1,21 g Tris – Base
0,37 g EDTA

Im Anschluss wurde mittels doppelt destilliertem Wasser auf 800 ml aufgefüllt. Daraufhin wurde der pH – Wert mit Salzsäure (ggf. auch Natronlauge) auf 9,0 eingestellt. Zum Schluss wurden 0,5 ml Tween®20 hinzugefügt und bis zu einem Endvolumen von 1000 ml mit doppelt destilliertem Wasser aufgefüllt.

Tris – gepufferte Salzlösung (engl.: Tris – buffered saline; TBS) in 10 – facher Konzentration

87,70 g Natriumchlorid
60,60 g Tris – Base
800 ml doppelt destilliertes Wasser

Die Feststoffe wurden im doppelt destillierten Wasser gelöst und nachfolgend wurde mittels Salzsäure (ggf. auch Natronlauge) der pH – Wert auf 7,6 eingestellt.

Im Anschluss wurde mit doppelt destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt.

Tris – gepufferte Salzlösung (engl.: Tris – buffered saline (TBS)) inklusive dem Detergenz Tween®20 (TBS - T)

100 ml TBS (10 – facher Konzentration)
ad 1000 ml doppelt destilliertes Wasser
Im Anschluss wurde der Lösung noch 0,5 ml Tween®20 zugesetzt.

1,5 M, 1 M und 50 mM Tris – HCl (pH = 8,8), (pH = 7,4), (pH = 6,8), (pH = 8,0) und 1% Tween®20

Folgende Mengen an Ausgangsstoff wurden je nach Konzentration eingewogen:

121,14 g Tris – Base (1 M Lösung)
181,71 g Tris – Base (1,5 M Lösung)
6,06 g Tris – Base (50 mM Lösung)
800 ml doppelt destilliertes Wasser

Der Feststoff wurde im doppelt destillierten Wasser gelöst und der pH – Wert wurde mittels Salzsäure (ggf. auch mit Natronlauge) auf die verschiedensten pH – Werte eingestellt. Im Anschluss wurde mit doppelt destilliertem Wasser auf 1000,0 ml aufgefüllt.

Um eine 1 M Tris – HCl (pH = 7,4) mit 1% Tween®20 herzustellen, wurden 15 ml Tris – HCl (pH = 7,4) mit 0,15 ml Tween®20 gemischt.

0,04% Trypanblau Lösung

Hierfür wurden 2 ml der 0,4% Trypanblau Lösung auf 20 ml mit PBS aufgefüllt.

Wasserstoffperoxid / Methanol-Gemisch

1,5 ml 30% H_2O_2 wurden zu 50 ml mit MeOH verdünnt.

Zitrat Puffer (10 mM, pH = 6,0)

18 ml Stammlösung A und 82 ml Stammlösung B wurden vermischt und danach wurde mittels doppelt destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt sowie 0,5 ml Tween®20 hinzugefügt.

Stammlösung A (0,1 M Zitronensäure):

19,20 g Zitronensäure wurden in 1000 ml doppelt destilliertem Wasser gelöst.

Stammlösung B (0,1 M Natriumzitrat):

29,40 g Natriumzitrat wurden in 1000 ml doppelt destilliertem Wasser gelöst.

<u>Bezeichnung</u>	<u>Verwendung</u>	<u>Hersteller</u>
Aqua ad injectabilia	Pufferherstellung	B. Braun
Blockierungspuffer (1)	IHC	siehe Ausgangsstoffe
Blockierungspuffer (2)	Western Blot	siehe Ausgangsstoffe
Bovine Serum Albumin	Western Blot	Carl Roth
dd H ₂ O	Herstellung von Lösungen / Verdünnungen	Kerndl H.
Differenzierungslösung	IHC	siehe Ausgangsstoffe
Elektrophoresepuffer	Western Blot	siehe Ausgangsstoffe
Erythrozyten – Lysis Puffer	Primärkultur	siehe Ausgangsstoffe
Ethanol (30%, 50%, 70%, 96%, 100%)	Dehydrierung / Rehydrierung	CLN Laborgroßhandel
Harris Hämatoxyllin	Hintergrundfärbung IHC	Sigma Aldrich
konz. Salzsäure	pH – Wert Einstellung	Merck
Leitungswasserersatzlösung nach Scott	IHC	siehe Ausgangsstoffe
Methanol	IHC / Western Blot	Sigma Aldrich
Natriumlaurylsulfatlösung (SDS)	MTT Assay und Western Blot	siehe Ausgangsstoffe
Natronlauge	pH – Wert Einstellung	Merck
Paraformaldehyd 4% (PFA)	Fixierung der Zellen für IF	siehe Ausgangsstoffe
PBS (1)	Zellkultur	Gibco

PBS (2)	IHC	Gibco
RIPA – Puffer	Western Blot	siehe Ausgangsstoffe
TBS Puffer	IHC / IF	siehe Ausgangsstoffe
TBS – T Puffer	IHC / IF	siehe Ausgangsstoffe
TE – Puffer	IHC	siehe Ausgangsstoffe
Transferpuffer	Western Blot	siehe Ausgangsstoffe
Tween®20 (Polysorbat 20)	Supplement	Sigma Aldrich
30% Wasserstoffperoxid	IHC	Carl Roth
Xylol	Dehydrierung / Rehydrierung	Fisher Chemicals

Tabelle 7: Verwendete Lösungen und Puffer

3.6 Antikörper

3.6.1 Primäre Antikörper

IHC und IF

<u>Zielstruktur</u>	<u>Herkunft</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Hersteller</u>
ERK1/2	rabbit anti – ERK1/2	1:100	Cell Signaling
p – ERK1/2	rabbit anti – p – ERK1/2	1:250	Cell Signaling
HSP90α/β	rabbit anti – HSP90α/β	1:300	Abcam
HSP90β	rabbit anti – HSP90β	1:750	Abcam

Tabelle 8: Verwendete primäre Antikörper für IHC und IF

Western Blot

<u>Zielstruktur</u>	<u>Herkunft</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Hersteller</u>
AKT	rabbit anti – AKT	1:2000	Cell Signaling
p – Ser473 AKT	rabbit anti – p – Ser473 AKT	1:2000	Cell Signaling
β – Aktin	mouse anti – β – Aktin	1:5000	Merck Millipore
ERK1/2	rabbit anti – ERK1/2	1:4000	Cell Signaling
p – ERK1/2	rabbit anti – p – ERK1/2	1:4000	Cell Signaling
GR	rabbit anti – GR	1:2000	Cell Signaling

HSP90 α	rabbit anti – HSP90 α	1:1000	Thermo Fisher
HSP90 β	rabbit anti – HSP90 β	1:1000	Thermo Fisher
MEK1/2	rabbit anti – MEK1/2	1:1000	Cell Signaling
p – Ser217/221 MEK1/2	rabbit anti – p – Ser217/221 MEK1/2	1:1000	Cell Signaling
c – Raf	rabbit anti – c – Raf	1:1000	Cell Signaling
p – Ser338 – c – Raf	rabbit anti – p – Ser338 – c – Raf	1:1000	Cell Signaling
RAS	rabbit anti – RAS	1:1000	Cell Signaling
RSK1/RSK2/RSK3	rabbit anti – RSK1/RSK2/RSK3	1:1000	Cell Signaling
p – Ser380 RSK	rabbit anti – p – Ser380 RSK	1:1000	Cell Signaling
mTOR	rabbit anti – mTOR	1:1000	Cell Signaling
p – Ser2448 TOR	rabbit anti – p – Ser2448 TOR	1:1000	Cell Signaling

Tabelle 9: Verwendete primäre Antikörper für Western Blot

3.6.2 Sekundäre Antikörper

<u>Bezeichnung</u>	<u>Herkunft</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Hersteller</u>
Alexa Fluor 488®	donkey anti – rabbit	1:200	Cell Signaling
Alexa Fluor 594®	donkey anti – rabbit	1:200	Cell Signaling
Sekundärer Antikörper Western Blot	anti – rabbit	1:2000	Cell Signaling
Sekundärer Antikörper Western Blot	anti – mouse	1:2000	Cell Signaling

Tabelle 10: Verwendete sekundäre Antikörper

3.7 Softwares, Datenbanken und Internetanwendungen

<u>Bezeichnung</u>	<u>Anwendung</u>
ChemSketch	Strukturformeln
GraphPad Prism	statistische Auswertung
Image J	Bildbearbeitung
Image Lab	Auswertung Western Blot
Synergy Score	Darstellung der Heatmaps

Tabelle 11: Eingesetzte Softwares, Datenbanken und Internetanwendungen

4. Methoden

Alle hierfür verwendeten Materialien sind unter dem Abschnitt „3. Materialien“ beschrieben.

4.1 Histologische Methoden

4.1.1 Verarbeitung von Nebennierenrindenkarzinom Xenograftgewebe

Das entnommene Xenograftgewebe wurde sofort in 4% frisch hergestellte PFA Lösung (ca. 10 ml je Gewebeprobe) gelegt und über Nacht bei 4°C unter Rollbewegung inkubiert. Am folgenden Tag wurde das 4% PFA entfernt und das Gewebe mittels einer Ethanolreihe dehydriert. Hierfür wurde jedes Gewebestück zuerst in 30% EtOH, 50% EtOH und zuletzt in 70% EtOH für jeweils 2 h inkubiert. Anschließend wurden die Gewebeproben separat in Einbettkassetten gelegt und in einem Gewebeautomaten nochmals für 2 x 2 h in 96% EtOH sowie 3 x 2 h in 100% EtOH entwässert. Nachdem die Gewebeproben in EtOH dehydriert wurden, kamen sie für weiter 2 x 2 h in Xylol und anschließend für 2 x 7 h in Paraffin. Im Anschluss wurden die Gewebe in bis auf 60°C erwärmten Paraffin eingebettet, die Paraffinblöcke wurden zum Verfestigen abgekühlt und anschließend bei Zimmertemperatur gelagert.

Am Mikrotom wurden Gewebeschnitte mit einer Dicke von 4 µm angefertigt und in einem ca. 40°C – 42°C warmen Wasserbad wurden Faltungen geglättet. Bis maximal drei Gewebeschnitte wurden anschließend auf einem Objektträger aufgenommen. Das überschüssige Wasser wurde abgeklopft und die Objektträger wurden im Trockenschrank bei 37°C über Nacht getrocknet. Zu Beginn jeder IHC wurde das Paraffin von den Gewebeschnitten entfernt und das Gewebe wieder hydriert: Zunächst wurden die Objektträger dazu 2 x 10 min in Xylol inkubiert. Anschließend erfolgte eine Ethanolreihe wie oben beschrieben nur in umgekehrter Reihenfolge. Bei dieser wurde das Gewebe 2 x 5 min in 100% EtOH, 5 min in 70% EtOH und 5 min in 30% EtOH inkubiert. Danach erfolgte die entsprechende immunhistochemische Färbung.

4.1.2 Immunhistochemie (IHC) von HSP90 α / β und HSP90 β an Nebennierenrindenkarzinom Xenograftgewebe

Die Objektträger wurden 2 min mit PBS gewaschen. Währenddessen wurde der Zitrat Puffer, welcher zur Antigenfreilegung bei der HSP90 α / β Färbung verwendet wurde, in der Mikrowelle auf der höchsten Stufe (Daewoo, KOR-6485, Mikrowellen – Leistung 700 W) für 3 min erhitzt. Im Anschluss wurden die Objektträger für 15 min auf der niedrigsten Stufe der Mikrowelle im Zitrat Puffer erhitzt und anschließend weitere 40 min auf Raumtemperatur abgekühlt. Es erfolgte ein weiterer Waschschrift für 5 min in PBS sowie eine 10 – minütige Inaktivierung der endogenen Peroxidasen mittels einer H₂O₂ / MeOH Lösung. Die Objektträger wurden erneut für 5 min mit PBS gewaschen und danach wurden unspezifische Bindungen mit dem frisch hergestellten Blockierungspuffer unterbunden. Hierfür wurden die Objektträger für 60 min mit dem Blockierungspuffer bei Raumtemperatur inkubiert. Ein weiterer Waschschrift für 5 min mit TBS - T folgte und die zweite Antikörper – Kontrolle sowie der primäre Antikörper HSP90 α / β (1:300 Verdünnung) wurden im Blockierungspuffer vorbereitet. Das Gewebe wurde über Nacht bei 4°C mit Blockierungspuffer (zweite Antikörper – Kontrolle) beziehungsweise primären Antikörper inkubiert. Am folgenden Tag wurde der primäre Antikörper entfernt und die Objektträger 4 x 5 min mit TBS - T gewaschen. Währenddessen wurde der sekundäre Antikörper vorbereitet. Hierfür wurde das DAKO – Kit Real EnVision Detection laut Herstellerangaben verwendet. Der Puffer mit dem sekundären Antikörper wurde für 30 min mit den Gewebeproben inkubiert und anschließend wurde nochmal 4 x 5 min mit TBS – T gewaschen. In der Zwischenzeit wurde die Substrat – Chromogen Lösung laut Herstellerangaben vorbereitet. Das Gewebe wurden für 30 s in dd H₂O getaucht für 4 min mit der Substrat – Chromogen Lösung für die HSP90 α / β Färbung bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde die Substrat – Chromogen Lösung entfernt und die Objektträger nochmals für 30 s in dd H₂O getaucht und anschließend für 5 min mit PBS gewaschen. Die Hintergrundfärbung wurde mittels Harris Hämatoxylin durchgeführt. Hierfür wurden die Objektträger für 30 s in dd H₂O, 90 s mit Harris Hämatoxyllin, 30 s mit Leitungswasser und anschließend für 3 min in Differenzierungslösung inkubiert. Danach kam das Gewebe nochmals für 30 s in Leitungswasser, für 60 s in Leitungswasserersatzlösung und für 60 s in dd H₂O. Für die Dehydrierung wurden folgende Schritte durchgeführt. Zuerst wurden die Objektträger für 2 min mit 30% EtOH inkubiert und danach wurden sie für 2 min in 70% EtOH, für 2 x 2 min in 100% EtOH und für 2 x 5 min in Xylol belassen. Die Deckgläser wurden mit Hilfe des

Roti – Histokitt II auf den Objektträgern befestigt und es konnten am folgenden Tag lichtmikroskopische Aufnahmen der Färbung durchgeführt werden.

Für die HSP90 β (1:750 Verdünnung in Blockierungspuffer) Färbung wurde wie oben beschrieben vorgegangen. Die einzigen Ausnahmen waren die unterschiedlichen Verdünnungen der primären Antikörper, dass hier zur Antigenfreilegung der TE – Puffer verwendet wurde und dass die Substrat – Chromogen Lösung für 90 s auf den Objektträgern belassen wurden.

4.1.3 Immunfluoreszenzfärbung (IF) an Nebennierenrindenkarzinomzelllinien

4.1.3.1 Aussäen und Fixierung unbehandelter Nebennierenrindenkarzinomzelllinien

NCI – H295R und MUC – 1 Zellen wurden, wie unter 4.2.1 und 4.2.2 beschrieben, passagiert und ausgezählt. Die beiden Zelllinien wurden separat in „chamber slides“ ausgesät (NCI – H295R: $1,5 \times 10^5$ bis $1,8 \times 10^5$ und MUC-1: 8×10^4 bis 1×10^5) und unter Kultivierungsbedingungen über Nacht im Inkubationsschrank gelagert. Am folgenden Tag wurden die Zellen auf den „chamber slides“ fixiert. Die Arbeit musste hierfür nicht mehr unter sterilen Bedingungen durchgeführt werden. Die Zellen wurden mittels PBS (je 1 ml / well) zweimal gewaschen und danach mit frisch hergestelltem 4% PFA (je 1 ml / well) für 30 min fixiert. Anschließend wurden die Zellen nochmals zweimal mit PBS (je 1 ml / well) gewaschen, 1 ml PBS / well wurde auf den Zellen belassen und für die kurzfristige Lagerung der „chamber slides“ wurden diese mittels Parafilm verschlossen und im Kühlschrank gelagert.

4.1.3.2 IF Färbung HSP90 α/β und HSP90 β in NCI – H295R und MUC – 1 Zellen

Zu Beginn der Färbung wurden die Zellen zweimal mit PBS kurz gewaschen. Während des Waschvorganges wurde der TE – Puffer beziehungsweise der Zitrat Puffer 3 min bei der höchsten Stufe der Mikrowelle erhitzt. Für die HSP90 α/β Färbung wurde der Zitrat Puffer und für HSP90 β Färbung der TE – Puffer verwendet. Für die Antigenfreilegung wurden die Objektträger mit den Zellen in den Puffern für die entsprechende Färbung 15 min bei der niedrigsten Temperatur der Mikrowelle inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger auf Raumtemperatur abgekühlt (ca. 40 min) und schließlich 5 min mit PBS gewaschen. Parallel wurde der Blockierungspuffer für die

Unterbindung von unspezifischen Antikörper – Antigen Bindungen hergestellt. Die Objektträger wurden mit dem Blockierungspuffer für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Objektträger 5 min mit TBS – T gewaschen. Im Anschluss wurden der primäre Antikörper sowie die sekundäre Antikörper – Kontrolle präpariert. Hierfür wurde folgendermaßen vorgegangen. Die Zellen, die für die sekundäre Antikörper – Kontrolle gedacht waren, wurden nochmals über Nacht bei 4°C mit Blockierungspuffer inkubiert. Der HSP90α/β (EPR3953, rabbit anti – human, Abcam) primäre Antikörper wurde in einer 1:300 Verdünnung und der HSP90β (E-296, rabbit anti – human, Abcam) primäre Antikörper in einer 1:750 Verdünnung jeweils in Blockierungspuffer hergestellt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nachfolgenden Tag wurde der primäre Antikörper entfernt und die Objektträger wurden 4 x 5 min mit TBS – T gewaschen. Anschließend wurde der sekundäre Antikörper vorbereitet. Dieser Schritt erfolgte in einem abgedunkelten Raum. Als sekundärer Antikörper wurde Alexa Fluor 594® (A21207, donkey anti – rabbit, Thermo Fisher Scientific) in einer 1:200 Verdünnung in Blockierungspuffer verwendet. Die Objektträger wurden mit dem sekundären Antikörper 1 h bei Raumtemperatur und in Dunkelheit inkubiert. Im Anschluss wurden die Objektträger nochmals 4 x 5 min mit TBS - T gewaschen und das Gitter, welches auf den Objektträgern war, wurde entfernt. Die Deckgläser wurden mit Mounting Medium (Vectashield with DAPI) auf den Objektträgern fixiert. Die IF – mikroskopischen Aufnahmen wurden am selben Tag oder den darauffolgenden Tag durchgeführt. Zwischenzeitlich wurden die Objektträger bei 4°C im Dunkeln gelagert.

4.1.3.3 IF Färbung ERK1/2 und p – ERK1/2 in MUC – 1 Zellen

Auch hier wurden zu Beginn die Objektträger zweimal mit PBS gewaschen und unspezifische Bindungen wurden im Anschluss mit Blockierungspuffer für 60 min bei Raumtemperatur geblockt. Der Puffer wurde anschließend entfernt und die Objektträger wurden 5 min mit PBS gewaschen. Für die sekundäre Antikörper – Kontrolle wurde auch hierfür der vorher beschriebene Blockierungspuffer verwendet. Als primäre Antikörper wurden ERK (9102, rabbit anti – human, CellSignaling) in einer 1:100 Verdünnung und p – ERK (9101, rabbit anti – human, CellSignaling) in einer 1:250 Verdünnung jeweils in Blockierungspuffer verwendet. Die primären Antikörper sowie die zweite Antikörper – Kontrolle (nur Blockierungspuffer) wurden über Nacht bei 4°C auf den Zellen belassen. Am folgenden Tag wurde der jeweilige primäre Antikörper von den Zellen entfernt und die Objektträger wurden mit PBS 4 x 5 min gewaschen. Anschließend wurde der sekundäre Antikörper, Alexa Fluor® 488 (A21206, donkey anti – rabbit, Thermo Fisher Scientific),

vorbereitet und für 1 h auf den Objektträgern belassen. Zum Schluss wurden diese nochmals 4 x 5 min mit PBS gewaschen und die Fixierung der Deckgläser sowie die Lagerung erfolgte ebenso wie unter 4.1.3.2 beschrieben.

4.2 *In vitro* Experimente an humanen Nebennierenrindenkarzinomzellen

4.2.1 Kultivierung der Nebennierenrindenkarzinomzelllinien

Das Arbeiten in der Zellkultur wurde immer unter sterilen Bedingungen in einer Laminar Flow Werkbank durchgeführt. Zwei NNRK Zelllinien humanen Ursprungs – NCI – H295R [30] und MUC – 1 [44] – wurden unter 5% CO₂, 100% Luftfeuchtigkeit und bei 37°C kultiviert. Für das wöchentliche Passagieren wurden 0.05% Trypsin – EDTA zum Trypsinieren und PBS zum Waschen der Zellen verwendet. Das Kultiviermedium für NCI – H295R Zellen setzte sich folgendermaßen zusammen: RPMI 1640 + GlutaMAX, 10% FBS, 1% Penicillin / Streptomycin und 1% ITS. MUC – 1 Zellen wurden in advanced DMEM / F12 und mit Ausnahme von 1% ITS genau wie NCI – H295R Zellen kultiviert. Zur Behandlung der Zellen wurde DMEM / F12 als Grundmedium verwendet. Weiterhin wurden für MUC – 1 Zellen 2% charcoal stripped Serum und 1% Penicillin / Streptomycin und bei NCI – H295R Zellen noch zusätzlich 1% ITS und 1% Glutamin hinzugefügt.

4.2.2 Auszählen von NNRK Zellen

Nach dem Trypsinieren der Zellen wurden diese mittels der Neubauer Zählkammer ausgezählt. Hierfür wurden die Zellen je nach Konfluenz mit 0.04% Trypanblau verdünnt und 10 µL auf die Zählkammer gegeben. Neun quadratische Linienfelder wurden ausgezählt und der Mittelwert ermittelt. Mit Hilfe der folgenden Gleichung: Durchschnitt der gezählten Zellen x 10000 x Verdünnungsfaktor der Zellen (in 0,04% Trypanblau) = Zellen / ml; Zellen / ml x Resuspensionsvolumen = Gesamtanzahl der Zellen; wurde die Anzahl der gesamten Zellen bestimmt. Daraufhin erfolgte die Berechnung der gewünschten Zellanzahl mittels Dreisatz. Auch das Auszählen sowie das Aussäen der Zellen erfolgten unter sterilen Bedingungen.

4.2.3 Behandlung der NNRK Zelllinien mit HSP90 Inhibitoren und mittels EDP – M

Sowohl NCI – H295R als auch MUC – 1 Zellen wurden mit denselben HSP90 Inhibitoren sowie mit den Wirkstoffen des EDP – M Schemas behandelt.

4.2.3.1 Zellviabilitäts – Assay

Die Zellviabilität wurde mittels MTT – Assay bestimmt. Hierbei wurde der wasserlösliche 3 - (4,5 – Dimethylthiazol – 2 – yl) - 2,5 – diphenyltetrazoliumbromid (MTT) Farbstoff in das wasserunlösliche Formazan reduziert (*Abbildung 7*). Dieser Vorgang findet aber lediglich in noch stoffwechselaktiven Zellen statt und somit konnten Rückschlüsse auf die Viabilität der NCI – H295R und MUC – 1 Zellen getroffen werden.

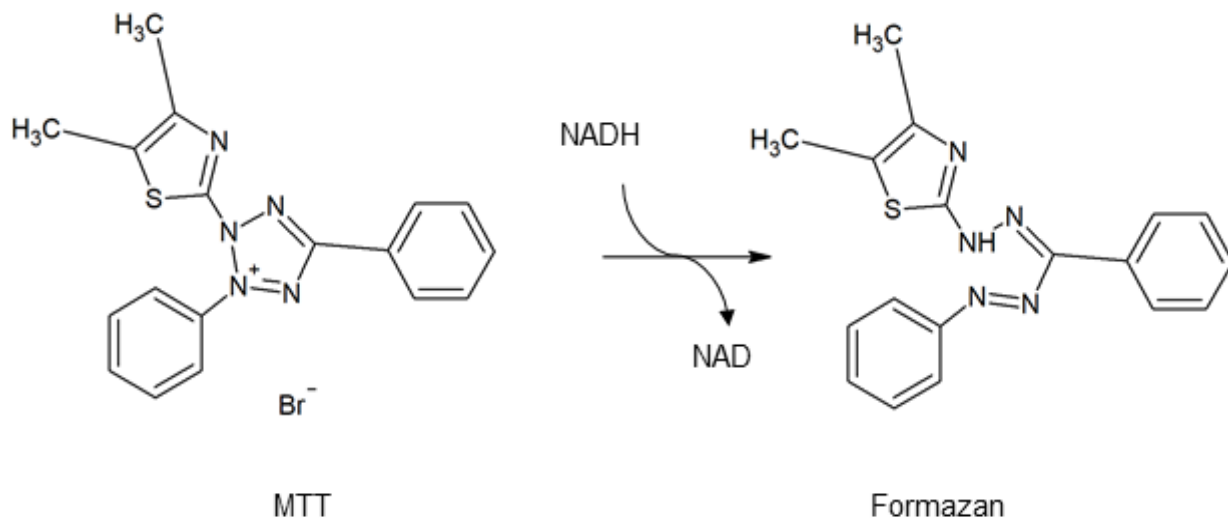


Abbildung 7: Reaktionsgleichung MTT

Umwandlung von MTT zur Formazan – Struktur mittels Reduktionsäquivalente.

Für die Einzelbehandlung mit HSP90 Inhibitoren wurden 5×10^3 NCI – H295R und 6×10^3 MUC – 1 Zellen in 96 – well Mikrotiterplatten ausgesät und über Nacht im Inkubationsschrank belassen, damit die Zellen sich auf den Boden der Platten absetzen konnten. Am darauffolgenden Tag wurde mit HSP90 Inhibitoren in steigender Konzentrationen behandelt. Nach 24 h, 48 h, 72 h und 96 h wurde das Behandlungsmedium mit Wirkstoff von den Zellen entfernt und es wurden

je 100 μ l 0,5 mg / ml MTT Lösung in jedes well pipettiert und für 2 h unter Standardkultivierbedingungen inkubiert. Anschließend wurden 100 μ l pro well einer 10% SDS Lösung hinzugefügt. Die Zellkulturplatten wurden mit Parafilm und Aluminiumfolie verschlossen und über Nacht im Labor gelagert. Somit konnte die vorherige Reaktion der gebildeten Formazan – Kristalle vollständig beendet werden. Am nächsten Tag wurde die Absorption mittels eines Absorptionsspektrometers bei der Messwellenlänge $\lambda = 570$ nm und der Referenzwellenlänge $\lambda = 655$ nm bestimmt und daraus die Zellviabilität kalkuliert.

<u>Wirkstoffe</u>	<u>Konzentration [μM]</u>	<u>Zeitpunkte [h]</u>
Silibinin	5,0; 10,0; 20,0; 40,0	24, 48, 72, 96
Novobiocin	12,5; 25,0; 50,0; 100,0	24, 48, 72, 96
17 – AAG	0,05; 0,1; 0,2; 0,4	24, 48, 72, 96
Luminespib	0,025; 0,05; 0,1; 0,2	24, 48, 72, 96
Ganetespib	0,025; 0,05; 0,1; 0,2	24, 48, 72, 96

Tabelle 12: Konditionen der HSP90 Inhibition [Einzelbehandlungen]

Für die Kombinationsbehandlung wurden vier HSP90 Inhibitoren (Silibinin, Novobiocin, Luminespib und Ganetespib) sowie die vier Wirkstoffe des EDP – M Schemas ausgewählt. Hierfür wurden 8×10^3 NCI – H295R und 6×10^3 MUC – 1 Zellen in 96 – well Mikrotiterplatten ausgesät. Bevor die Kombinationsbehandlung durchgeführt wurde, musste zuerst der wirksame Konzentrationsbereich der Einzeldosierung von Doxorubicin, Cisplatin, Etoposid und Mitotane bestimmt werden. Folgende Konzentrationen der Wirkstoffe und Behandlungszeitpunkte wurden verwendet. Die Detektion erfolgte wie unter der Einzelbehandlung beschrieben.

<u>Wirkstoffe</u>	<u>Konzentration [μM]</u>	<u>Zeitpunkte [h]</u>
Doxorubicin	0,2; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 7,0; 10,0	24, 48, 72, 96
Etoposid	5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 100,0; 150,0; 200,0	24, 48, 72, 96
Cisplatin	5,0; 10,0; 20,0; 40,0; 60,0; 80,0; 100,0	24, 48, 72
Mitotane	1,0; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 100,0	24

Tabelle 13: Konditionen der EDP – M Behandlung [Einzelbehandlung]

Im Anschluss wurden folgende Konzentrationen und Zeitpunkte für die Kombinationsbehandlung ausgewählt.

<u>NCI-H295R</u>		<u>Zeitpunkte</u> <u>[h]</u>	<u>MUC-1</u>		<u>Zeitpunkte</u> <u>[h]</u>
<u>Wirkstoffe [µM]</u>			<u>Wirkstoffe [µM]</u>		
<u>Doxorubicin:</u>	<u>Luminespib:</u>	48	<u>Doxorubicin:</u>	<u>Luminespib:</u>	48
1,0; 2,0; 5,0; 7,0	0,01; 0,1		1,0; 2,0; 5,0; 7,0	0,01; 0,1	
<u>Doxorubicin:</u>	<u>Ganetespib:</u>	48	<u>Doxorubicin:</u>	<u>Ganetespib:</u>	48
1,0; 2,0; 5,0; 7,0	0,025; 0,1		1,0; 2,0; 5,0; 7,0	0,025; 0,1	
<u>Doxorubicin:</u>	<u>Novobiocin:</u>	48	<u>Doxorubicin:</u>	<u>Novobiocin:</u>	48
1,0; 2,0; 5,0; 7,0	12,5; 100,0		1,0; 2,0; 5,0; 7,0	12,5; 100,0	
<u>Doxorubicin:</u>	<u>Silibinin:</u>	48	<u>Doxorubicin:</u>	<u>Silibinin:</u>	48
1,0; 2,0; 5,0; 7,0	5,0; 40,0		1,0; 2,0; 5,0; 7,0	5,0; 40,0	
<u>Etoposid:</u>	<u>Luminespib:</u>	48	<u>Etoposid:</u>	<u>Luminespib:</u>	72
10,0; 25,0; 50,0; 100,0	0,01; 0,1		10,0; 25,0; 50,0; 100,0	0,01; 0,1	

<u>Etoposid:</u>	<u>Ganetespib:</u>	48	<u>Etoposid:</u>	<u>Ganetespib:</u>	72
10,0; 25,0; 50,0; 100,0	0,025; 0,1		10,0; 25,0; 50,0; 100,0	0,01; 0,1	
<u>Etoposid:</u>	<u>Novobiocin:</u>	48	<u>Etoposid:</u>	<u>Novobiocin:</u>	72
10,0; 25,0; 50,0; 100,0	12,5; 100,0		10,0; 25,0; 50,0; 100,0	12,5; 100,0	
<u>Etoposid:</u>	<u>Silibinin:</u>	48	<u>Etoposid:</u>	<u>Silibinin:</u>	72
10,0; 25,0; 50,0; 100,0	5,0; 40,0		10,0; 25,0; 50,0; 100,0	5,0; 40,0	
<u>Cisplatin:</u>	<u>Luminespib:</u>	24	<u>Cisplatin:</u>	<u>Luminespib:</u>	24
10,0; 20,0; 40,0; 60,0	0,01; 0,1		10,0; 20,0; 40,0; 60,0	0,01; 0,1	
<u>Cisplatin:</u>	<u>Ganetespib:</u>	24	<u>Cisplatin:</u>	<u>Ganetespib:</u>	24
10,0; 20,0; 40,0; 60,0	0,025; 0,1		10,0; 20,0; 40,0; 60,0	0,025; 0,1	

<u>Cisplatin:</u>	<u>Novobiocin:</u>	24	<u>Cisplatin:</u>	<u>Novobiocin:</u>	24
10,0; 20,0; 40,0; 60,0	12,5; 100,0		10,0; 20,0; 40,0; 60,0	12,5; 100,0	
<u>Cisplatin:</u>	<u>Silibinin:</u>	24	<u>Cisplatin:</u>	<u>Silibinin:</u>	24
10,0; 20,0; 40,0; 60,0	5,0; 40,0		10,0; 20,0; 40,0; 60,0	5,0; 40,0	
<u>Mitotane:</u>	<u>Luminespib:</u>	24	<u>Mitotane:</u>	<u>Luminespib:</u>	24
5,0; 10,0; 25,0; 50,0	0,01; 0,1		5,0; 10,0; 25,0; 50,0	0,01; 0,1	
<u>Mitotane:</u>	<u>Ganetespib:</u>	24	<u>Mitotane:</u>	<u>Ganetespib:</u>	24
5,0; 10,0; 25,0; 50,0	0,025; 0,1		5,0; 10,0; 25,0; 50,0	0,025; 0,1	
<u>Mitotane:</u>	<u>Novobiocin:</u>	24	<u>Mitotane:</u>	<u>Novobiocin:</u>	24
5,0; 10,0; 25,0; 50,0	12,5; 100,0		5,0; 10,0; 25,0; 50,0	12,5; 100,0	
<u>Mitotane:</u>	<u>Silibinin:</u>	24	<u>Mitotane:</u>	<u>Silibinin:</u>	24
5,0; 10,0; 25,0; 50,0	5,0; 40,0		5,0; 10,0; 25,0; 50,0	5,0; 40,0	

Tabelle 14: Konditionen der Kombinationsbehandlung [HSP90 Inhibitor – EDP – M]


4.2.3.2 Zellproliferations – Assay

Es wurden 8×10^3 NCI – H295R und 6×10^3 MUC – 1 Zellen in Triplikaten in 96 – well Mikrotiterplatten ausgesät und am darauffolgenden Tag mit HSP90 Inhibitoren (vergleiche Einzeldosierung) behandelt. Nach 12 beziehungsweise 48 stündiger Behandlungsperiode wurde nach Herstelleranweisung mittels dem Zellproliferations – ELISA (kolorimetrische Immun – Assay BrdU) die Proliferationsrate bestimmt. Die Messwerte wurden mit der unbehandelten Probe in Beziehung gesetzt.

4.2.3.3 Apoptose – Assay

Für die Quantifizierung einer möglichen pro – apoptotischen Wirkung der HSP90 Inhibitoren wurde das Caspase – Glo 3 / 7 Assay verwendet. Hierfür wurden 8×10^3 NCI – H295R und 8×10^3 MUC – 1 Zellen in 96 – well Mikrotiterplatten in Triplikaten ausgesät und über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit den entsprechenden Konzentrationen an HSP90 Inhibitoren behandelt (vergleiche Einzeldosierung). Nach der 24 stündiger Behandlungsdauer wurde die Apoptoserate der Zellen nach Herstelleranweisung mittels Lumineszenz Detektion am Victor 1420 bestimmt. Verglichen wurden die Messwerte zur unbehandelten Probe.

4.2.3.4 Zellmigrations – Assay

Die Auswirkungen der HSP90 Inhibitoren auf die Zellmigration wurden mithilfe des „wound healing assays“ bestimmt. Dabei wurden selbstklebende „inserts“ () in 6 – well Mikrotiterplatten gelegt, $3,7 \times 10^4$ für NCI – H295R und $1,0 \times 10^4$ für MUC – 1 Zellen in beide Seiten der „inserts“ (je 70 μ l) in Triplikaten ausgesät und die Zellen über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit der entsprechenden Konzentration an HSP90 Inhibitoren (0,2 μ M Luminespib; 0,2 μ M Ganetespib; 40,0 μ M Silibinin, 100,0 μ M Novobiocin und Vehikel) behandelt. Hierfür wurden je 2 ml / well in die 6 – well Mikrotiterplatten pipettiert und die „inserts“ entfernt. Dadurch ist eine zell – freie Fläche entstanden, von welcher nach verschiedenen Zeitpunkten (0 h, 9 h, 24 h, 48 h) lichtmikroskopische Bilder aufgenommen und die zell – freien Flächen mittels Image J Software bestimmt wurden.

4.3 Primärkultur NNRK (in Kooperation mit Dr. Nölting)

4.3.1 Krankheitsgeschichte des Patienten

Es handelte sich um eine 32 – jährige Patientin, bei der im Jahre 2017 ein rechtsseitiges Nebennierenrindenkarzinom diagnostiziert wurde. Zu diesem Zeitpunkt litt die Patientin unter einem Kortisol – und Androgenexzess. Nach Resektion des Nebennierentumors zusammen mit der rechten Niere und der lokoregionären Lymphknoten wurde die Patientin mit Mitotane behandelt und einer regelmäßigen Verlaufskontrolle unterzogen. Anfang 2018 wurden bei der Patientin pulmonale Metastasen erstdiagnostiziert und mit drei Zyklen EDP – M behandelt. Das Fortschreiten der Erkrankung / Metastasierung konnte allerdings nicht verhindert werden, woraufhin die Patientin als Zweitlinien – Therapie vier Zyklen Streptozotocin und Mitotane erhielt. Nach der Diagnose von Lebermetastasen wurde anschließend mit vier Zyklen Gemcitabin und Capecitabin behandelt. Die Zellen der Primärkultur stammen aus einer Lungen – und einer Zwerchfellmetastase.

4.3.2 Gewinnung der Primärkulturzellen und Behandlung mit Luminespib und Ganetespib

Die Lungen – und Zwerchfellmetastase wurden vom zuständigen Pathologen überprüft und es wurde bestätigt, dass die Metastasen morphologisch vereinbar mit dem diagnostizierten Nebennierenrindenkarzinom waren. Das Tumorgewebe wurde im sterilen PBS und auf Eis vom OP zur sterilen Laminar – Flow Bank transportiert. Alle Präparationsschritte des Tumorgewebes wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Das Tumorgewebe wurde von Fettgewebe, Bindegewebe und Gefäßen frei präpariert. Anschließend wurde der Tumor zerkleinert, in einem Gefäß, gefüllt mit PBS, aufgenommen und bei 1100 rpm, ca. 5 min zentrifugiert. Es erfolgte der Kollagenverdau und die Erythrozyten – Lyse. Hierbei wurde das Tumorgewebe mit Kollagenase II (1 mg / ml) 50 min inkubiert und anschließend wurde die Kollagenase mittels FCS inaktiviert. Danach folgte nochmals ein Zentrifugationsschritt bei 1100 rpm für 5 min. Der entstandene Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde mit Erythrozyten – Lysispuffer (9:1) versetzt und 7 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde nochmals bei 1100 rpm für 5 min zentrifugiert. Zum Schluss wurden die Zellen (2×10^3 Zellen / well) in 100 µl Medium / well in einer 96 – well Mikrotiterplatte in RPMI (1640) mit GlutaMAX, 10 % FCS, 1% Penicillin / Streptomycin

und 0,4% Amphotericin B ausgesät und unter Standardkultivierungsbedingungen kultiviert. Die Zellen wurden, nachdem sie zwei Tage inkubiert wurden, behandelt. Die ausgesäten Primärzellen wurden mit 0,2 μM Luminespib beziehungsweise 0,2 μM Ganetespib für 72 h behandelt (100 μl / well). Anschließend wurde das CellTiter Blue Assay nach der Anweisung des Herstellers durchgeführt. Hierfür wurde nach der Behandlungsdauer 20 μl / well vom CellTiter – Blue® Reagenz hinzugefügt und die Platten für 10 s geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen maximal für 6 h unter Kultivierungsbedingungen inkubiert und nochmals für 10 s geschüttelt. Der Einfluss der HSP90 Inhibitor Therapie auf die Zellviabilität wurde mittels Fluoreszenzmessung (560 nm / 590 nm) bestimmt.

4.4 Proteinbiochemie (in Kooperation mit Dr. Ciato)

4.4.1 Proteinextraktion

Es wurden 8×10^5 NCI – H295R und 8×10^5 MUC – 1 Zellen in 6 – well Mikrotiterplatten in Triplikaten je Wirkstoff ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit HSP90 Inhibitoren (0,2 μM Luminespib; 0,2 μM Ganetespib; 100,0 μM Novobiocin; 40,0 μM Silibinin) für 48 h behandelt. Nach Ablauf der Behandlungszeit wurden die Zellen zuerst auf Eis gestellt und das Behandlungsmedium wurde entfernt. Anschließend wurden die Zellen mit je 1 ml kaltem PBS gewaschen. Während des Waschvorgangs wurde der Lysis – Puffer vorbereitet. Hierfür wurde PhosphoStop in einer 1:10 und der Protease – Inhibitor in einer 1:100 Verdünnung verwendet. Danach wurde mit RIPA – Puffer auf die gewünschte Menge aufgefüllt. Grundlage für die Gesamtmenge war die Angabe, das für jedes well 120 μl Lysis – Puffer benötigt wurden. Im Anschluss wurde das PBS wieder entfernt und 120 μl Lysis – Puffer wurde in jedes well pipettiert. Danach wurden die Zellen mittels Zellschaber von der Zellkulturplatte entfernt und in die jeweiligen vorbereiteten Mikroreaktionsgefäße pipettiert. Der nachfolgende Zentrifugationsschritt erfolgte für 10 min bei 4°C und 15000 rpm. Die dadurch entstandenen Überstände, das Zelllysate, der verschiedenen Behandlungen wurde in vorbereitete Mikroreaktionsgefäße überführt und bei -80°C bis zum weiteren Gebrauch gelagert. Die Zellpellets wurden verworfen.

4.4.2 SDS – Gelelektrophorese und Western Blot

Mittels Western Blot Analyse wurden spezifische Proteine und deren Veränderung unter HSP90 Inhibitor Therapie bestimmt. Die Analyse erfolgte mittels Gelelektrophorese. Hierbei wurden die Proteine nach ihrer Größe getrennt und im Anschluss auf eine Membran übertragen. Die Visualisierung erfolgte mittels Inkubation mit spezifischen primären Antikörpern und der nachfolgenden Inkubation mit einem sekundären Antikörper, welcher mit HRP (Horse radish peroxidase) gekoppelt war. Zum Schluss wurde ein ECL (enhanced chemiluminescence) Substrat hinzugefügt, woraufhin die Proteinbanden sichtbar gemacht wurden. Die Intensität der Proteinbanden wurde mit dem Proteingehalt korreliert, sofern die gleiche Ausgangsmenge an Protein aufgetragen wurde. Somit war eine relative Quantifizierung des Proteingehaltes möglich.

Das Zelllysat wurde in ein 37°C warmes Wasserbad aufgetaut und danach homogenisiert indem das Zelllysat 10 x durch eine Insulinspritze gezogen wurde. Im Anschluss wurden die Proben 15 min bei 16000 g und 4°C zentrifugiert. Aus den entstandenen Überständen wurde der Proteingehalt der jeweiligen Proben anhand der Bradford – Methode bestimmt. Hierfür wurden die Herstellerangaben befolgt. Als Standard wurde BSA eingesetzt. Die Proben wurden mit dem Probenpuffer (Roti®Load I) vermischt und 5 min bei 95°C denaturiert. Daraufhin wurde eine SDS – PAGE (Sodiumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese) durchgeführt und die aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nitrocellulose Membran über Nacht bei einer angelegten Spannung von 25 V im Transferpuffer übertragen. Unspezifische Bindungen wurden mit TBS – T + 5 % entrahmter Milch für 1 h bei Raumtemperatur geblockt. Anschließend wurde die Membran mit den entsprechenden primären Antikörpern (*Tabelle 9*) über Nacht bei 4°C inkubiert, 3 x 5 min mit TBS – T gewaschen und danach für 1 h mit dem sekundären Antikörper bei Raumtemperatur inkubiert. Nochmals wurde 3 x 5 min mit TBS – T gewaschen und das ECL Substrat hinzugefügt. Die Detektion erfolgte mittels ChemiDoc Biorad.

4.5 Quantifizierung der Steroidsynthese

Es wurden 8×10^5 NCI – H295R Zellen als Triplikate in 6 – well Mikrotiterplatten ausgesät und über Nacht unter Kultivierungsbedingungen gelagert. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit HSP90 Inhibitoren (100,0 µM Novobiocin, 40,0 µM Silibinin, 0,4 µM 17 – AAG, 2,0 µM Luminespib und 2,0 µM Ganetespib) behandelt und nach 6 h beziehungsweise nach 24 h wurden 2 ml der Überstände je Probe gesammelt. Diese wurden dann bei 5 min, 6000 rpm und bei

Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde 1 ml je Probe in neue Gefäße pipettiert und bis zur Kortisolmessung bei -20°C gelagert. Die Kortisolmessung wurde am Liaison Diasorin unter Anweisung der zuständigen technischen Assistentin durchgeführt. Für die Zellviabilitätsmessung mittels MTT wurde, wie unter 4.2.3.1 beschrieben, vorgegangen. Für die hier verwendeten 6 – well Mikrotiterplatten wurden die Volumina von 0,5 mg / ml MTT Lösung und 10% SDS Lösung angepasst.

In der MUC – 1 Zelllinie konnte im 6 – well Format bei verschiedenen Zellzahlen (8×10^5 bis $1,4 \times 10^6$) kein Kortisol detektiert werden. Ab einer Anzahl von 2×10^6 MUC – 1 Zellen war im 6 – well Format ein geringer Kortisolgehalt detektierbar. Dieser stand aber in keinem Verhältnis zu dem Kortisolgehalt, welcher in NCI – H295R Zellen bestimmt wurden war. Daher wurden die MUC – 1 Zellen für den nächsten Versuch in größeren Zellkulturschalen ausgesät, um durch die Erhöhung der Zellzahl eine Steigerung der Kortisolsekretion zu erreichen. Hierfür wurden 10×10^6 bis 19×10^6 in Zellkulturschalen ausgesät. Nach 24 h wurde der Überstand gesammelt und vermessen. Hier war bei jeder gewählten Zellzahl Kortisol messbar, bei 15×10^6 Zellen wurde der höchste Wert detektiert und mit steigender Zellzahl (bis 19×10^6) nahm der Kortisolgehalt wieder ab. Da das Format der Zellkulturschalen zu unwirtschaftlich war, bezüglich Mediumverbrauch und Dauer der Anzucht der benötigten Anzahl an MUC – 1 Zellen, waren die Zellkulturschalen keine lukrative Alternative. In einem 96 – well Format (6×10^3 MUC – 1 Zellen / well) wurde auch nach längerer Inkubation (48 h, 72 h, 96 h) kein Kortisolgehalt detektiert.

Aufgrund der nicht konstanten Messung des Kortisolgehaltes in MUC – 1 Zellen in den oben beschriebenen Vorexperimenten wurde die MUC – 1 Zelllinie aus dem Versuch zur Kortisolsekretion ausgeschlossen.

4.6. Statistische Analyse

Die statistische Analyse wurde mit GraphPad Prism durchgeführt und die Zahlenwerte wurden durch Wert \pm Standardabweichung angegeben. Statistische Signifikanz wurde mittels der Varianzanalyse (ANOVA oder mittels dem Kruskal – Wallis Test) ermittelt. Anschließend wurde entweder die Bonferroni oder Dunnett Korrektur durchgeführt. Die SynergyScores wurden mittels einer Internet Anwendung³ (ZIP Methode) kalkuliert [139]. Die statistische Signifikanz wurde als $P < 0,05$ definiert und wie folgt bei der höchsten HSP90 Inhibitor Konzentrationen gekennzeichnet: *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$; ****, $P < 0,0001$. Ausnahmen dieser Kennzeichnung sind in den Abbildungen zu erkennen.

³ <https://synergyfinder.fimm.fi/>

5. Ergebnisse

5.1 Expression und Lokalisation der Zielstruktur HSP90

Die immunhistochemische Analyse von NCI – H295R und MUC – 1 Xenograft Gewebeschnitten ergab eine intensivere Expression von HSP90 α/β (Abbildung 8) in MUC – 1 im Vergleich zu NCI – H295R. HSP90 β war sowohl in NCI – H295R als auch in MUC – 1 Xenograft Gewebe nachweisbar. Jedoch war auch hier die HSP90 β Färbung in MUC – 1 Xenograft Gewebe deutlich stärker ausgeprägt (Abbildung 9).

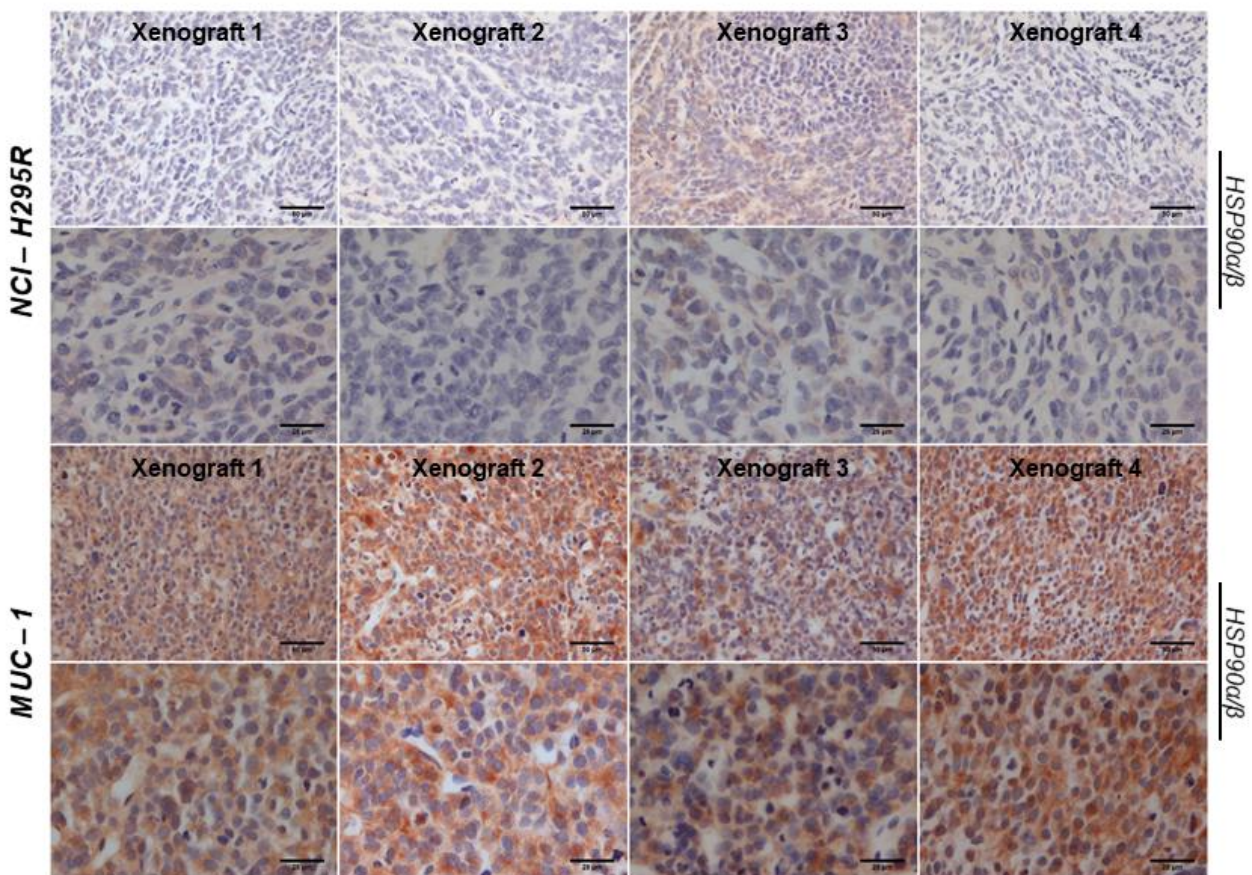


Abbildung 8: Immunhistochemie HSP90 α/β

Immunhistochemische Färbung von HSP90 α/β an NCI – H295R und MUC – 1 Xenograft Gewebeschnitten. Die Messbalkenskala entspricht 25 µm.

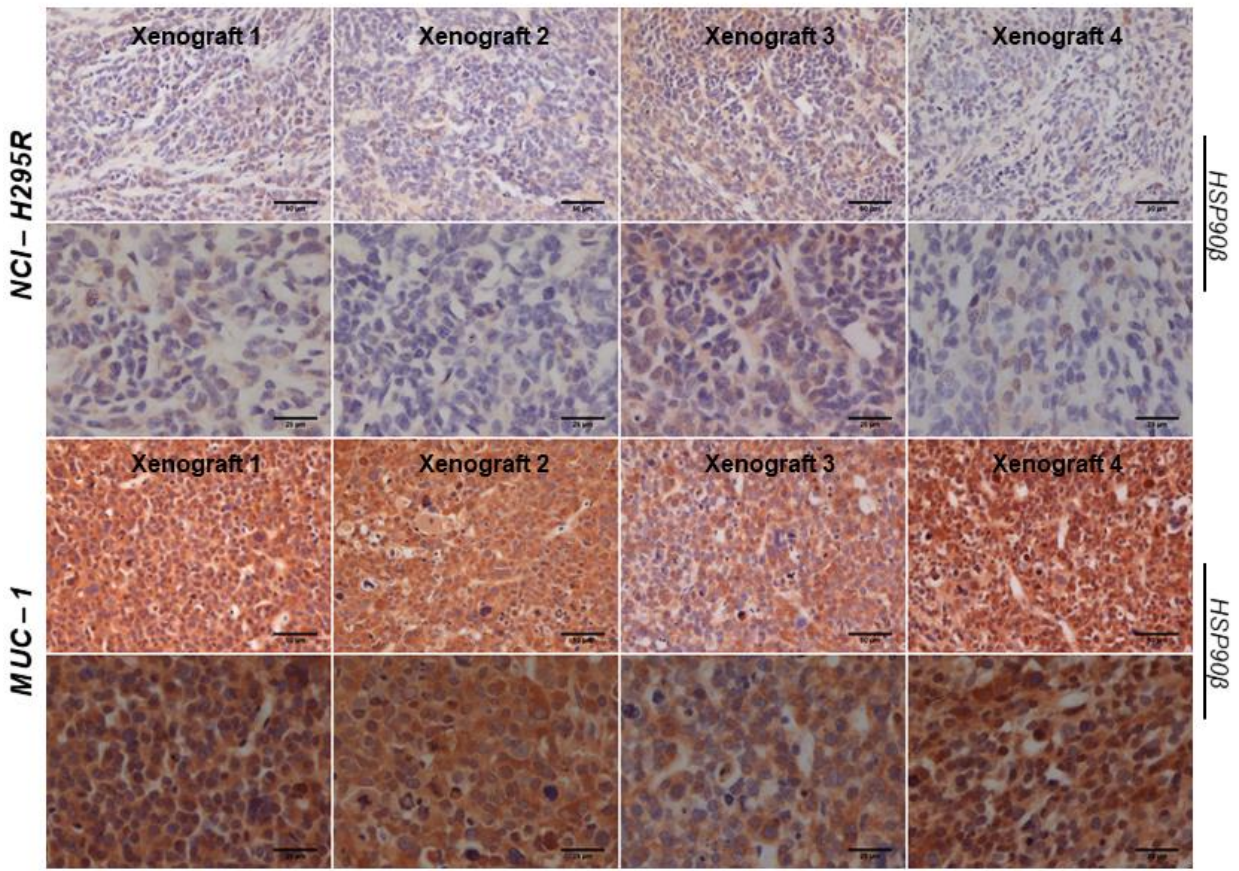


Abbildung 9: Immunhistochemie HSP90β

Immunhistochemische Färbung von HSP90β an NCI – H295R und MUC – 1 Xenograft Gewebeschnitten. Die Messbalkenskala entspricht 25 μm.

Anhand von Immunfluoreszenzfärbungen konnte gezeigt werden, dass HSP90α/β nuklear und zytoplasmatisch in NCI – H295R und MUC – 1 Zellen lokalisiert waren. HSP90β war vor allem im Zytoplasma aufzufinden (Abbildung 10)

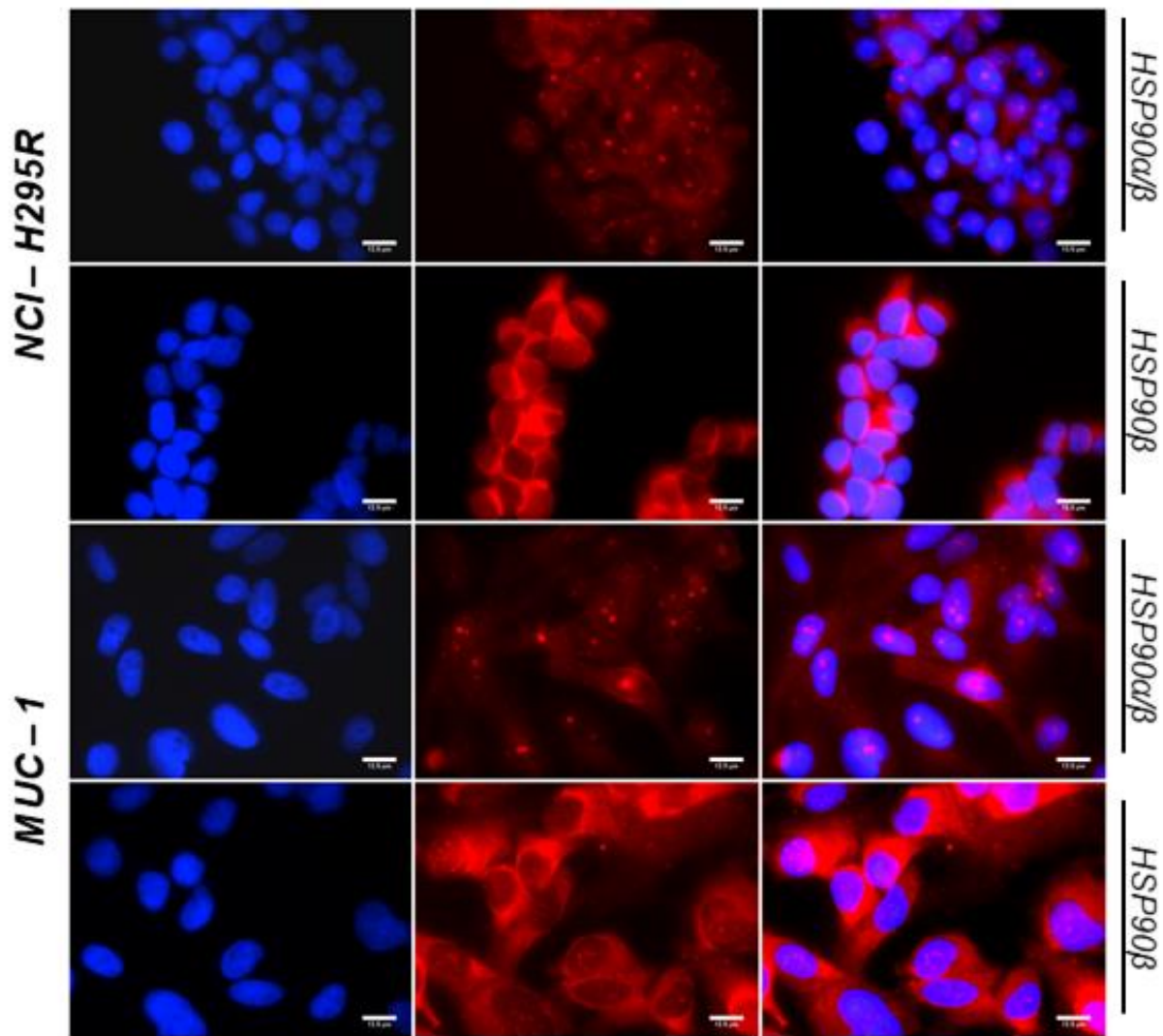


Abbildung 10: Immunfluoreszenz

Veranschaulichung der Lokalisation von der HSP90α/β und der HSP90β Isoform in NCI – H295R und MUC – 1 Zellen mittels Immunfluoreszenzfärbung. Die Messbalkenskala entspricht 12,5 μm.

5.2 Auswirkung einer HSP90 Inhibition auf die Expression von HSP90 und GR

Nach 48 stündiger Behandlung von NCI – H295R und MUC – 1 Zellen mittels HSP90 Inhibitoren zeigten sowohl C – terminale (Novobiocin und Silibinin) als auch N – terminale (Luminespib und Ganetespib) HSP90 Inhibitoren keinen Effekt auf die Expression von HSP90α und HSP90β (Abbildung 11). Da man keine Abnahme von HSP90α und HSP90β nach HSP90 Inhibitor Therapie

verzeichnen konnte, ist davon auszugehen, dass die hier verwendeten HSP90 Inhibitoren nicht die Expression von HSP90 blockierten, sondern dessen Funktion. Des Weiteren zeigten Western Blot Ergebnisse eine erwartete Reduktion des Glukokortikoidrezeptors, welcher ein Client Protein des HSP90 widerspiegelt. Diese Reduktion war nach 48 stündiger Behandlung mit Luminespib und Ganetespib in beiden verwendeten NNRK Zelllinien zu beobachten. Novobiocin und Silibinin zeigten diese Abnahme nicht (*Abbildung 12*).

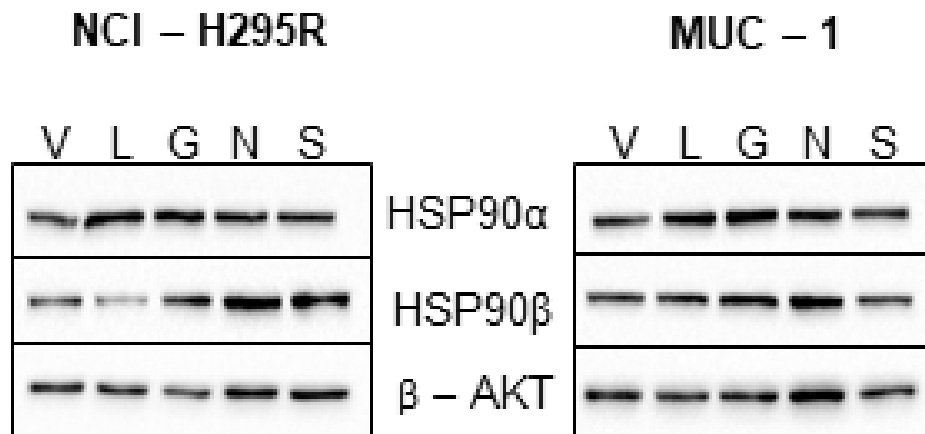


Abbildung 11: Western Blot Analyse von HSP90α und HSP90β

Behandlung von NCI – H295R und MUC – 1 Zellen mit HSP90 Inhibitoren für 48 h zeigt keine Reduktion der HSP90 Isoformen α und β. Abkürzungen: V: Vehikel 1:1000 DMSO; L: Luminespib 0,2 μM; G: Ganetespib 0,2 μM; N: Novobiocin 100,0 μM; S: Silibinin 40,0 μM.

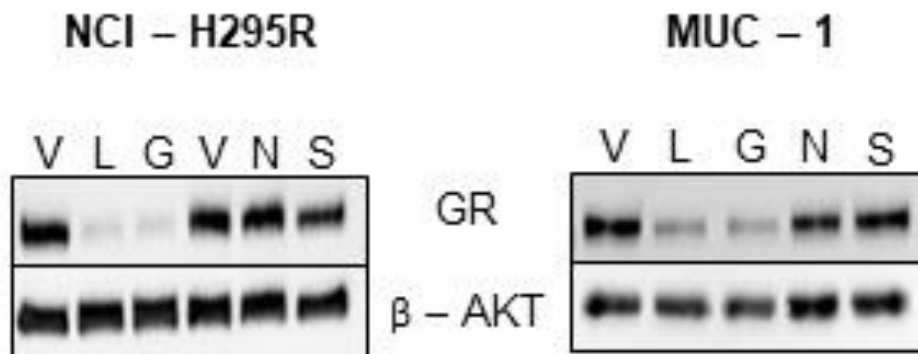


Abbildung 12: Western Blot Analyse des Glukokortikoidrezeptors

Eine Abnahme des Glukokortikoidrezeptors wird bei der 48 stündigen Behandlung mittels Luminespib und Ganetespib in NCI – H295R und in MUC – 1 Zellen detektiert. Abkürzungen: V: Vehikel 1:1000 DMSO; L: Luminespib 0,2 μM; G: Ganetespib 0,2 μM; N: Novobiocin 100,0 μM; S: Silibinin 40,0 μM.

5.3 Effekte von HSP90 Inhibitoren auf adrenokortikale Zelllinien (Einzeldosierungen)

5.3.1 Zellviabilität

Luminespib (L) und Ganetespib (G) zeigten konzentrations – und zeitabhängige hochsignifikante Effekte auf die Zellviabilität in NCI – H295R Zellen nach kurzer Behandlungsdauer (48 h 0,2 μ M L: 36,1% \pm 2,6%; 48 h 0,2 μ M G: 37,1% \pm 2,6% im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe). 17 – AAG war in NCI – H295R Zellen im gewählten Konzentrationsbereich und zu den gewählten Behandlungszeitpunkten unwirksam (*Abbildung 13*). Auch MUC – 1 Zellen reagierten hoch signifikant auf die Behandlung von N – terminalen HSP90 Inhibitoren, Luminespib und Ganetespib (48 h 0,2 μ M L: 59,0% \pm 4,4%; 48 h 0,2 μ M G: 62,6% \pm 0,5% im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe). Hier konnten auch für 17 – AAG (A) signifikante Effekte bezüglich Zellviabilität bewiesen werden (72 h 0,4 μ M A: 65,7% \pm 5,3% im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe). Die beiden ausgewählten C – terminalen HSP90 Inhibitoren, Novobiocin (N) und Silibinin (S), zeigten in keiner der Nebennierenrindenkarzinomzelllinien eine Wirkung auf die Zellviabilität (*Abbildung 13*). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass beide Zelllinien signifikant auf die N – terminale HSP90 Inhibitor Therapie ansprachen. Jedoch war die Wirkungseffizienz in NCI – H295R deutlich stärker als in MUC – 1 Zellen.

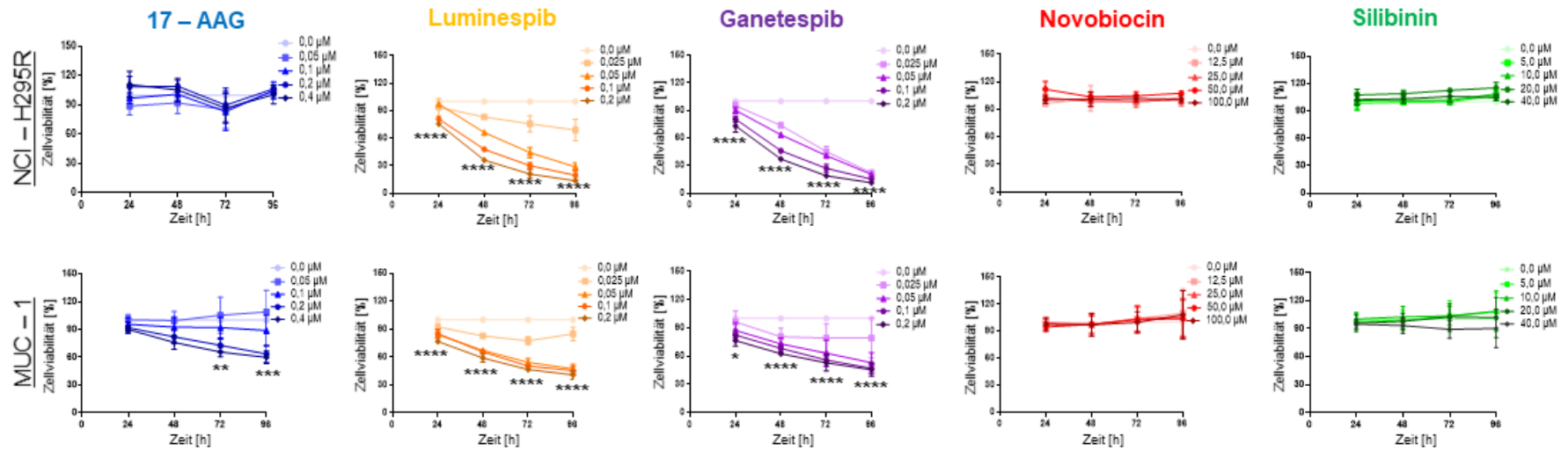


Abbildung 13: Effekte von HSP90 Inhibitoren auf die Zellviabilität

Untersuchung der Effekte von N – und C – terminalen HSP90 Inhibitoren auf die Zellviabilität von NCI – H295R und MUC – 1 Zellen.

5.3.2 Proliferation

Anti – proliferative Wirkungen zeigten Luminespib und Ganetespib in beiden Nebennierenrindenkarzinomzelllinien, besonders nach 48 stündiger Behandlungsdauer (NCI – H295R: 48 h 0,2 μ M L: 8,1% \pm 9,2% und 48 h 0,2 μ M G: 13,9% \pm 14,3% im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe; MUC – 1: 48 h 0,2 μ M L: 0,90% \pm 1,6% und 48 h 0,2 μ M G: 8,4% \pm 9,7% im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe). 17 – AAG reduziert die Proliferationsrate nur in MUC – 1 Zellen signifikant (48 h 0,4 μ M A: 30,3% \pm 11,7% im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe). Die verwendeten C – terminalen HSP90 Inhibitoren konnten keinen signifikanten Effekt auf die Zellproliferation von NCI – H295R und MUC – 1 Zellen zeigen (*Abbildung 14*).

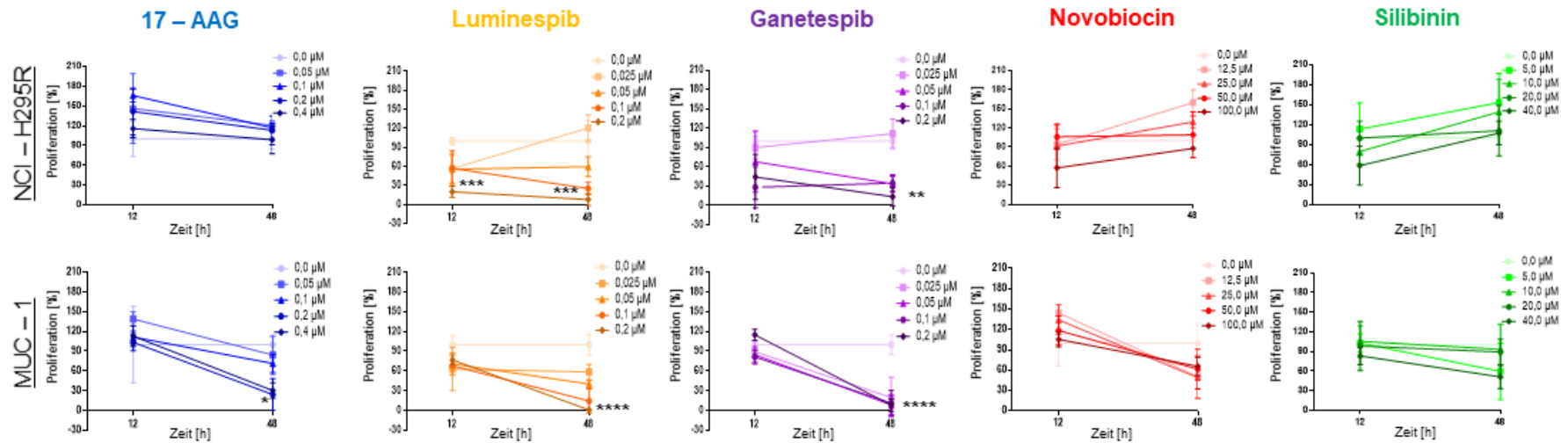


Abbildung 14: Effekte von HSP90 Inhibitoren auf die Proliferation

Untersuchung der anti – proliferativen Effekte von N – und C – terminalen HSP90 Inhibitoren in NCI-H295R und MUC-1 Zellen.

5.3.3 Apoptose

Eine Induktion der Apoptose konnte lediglich in NCI – H295R Zellen unter Luminespib und Ganetespib Therapie erfasst werden (24 h 0,2 μ M L: 180,4% \pm 48,9% und 24 h 0,2 μ M G: 175,7% \pm 35,0% im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe). 17 – AAG zeigte lediglich in MUC – 1 Zellen eine leicht signifikante apoptotische Wirkung (24 h 0,4 μ M A: 117,4% \pm 5,9% im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe). Keine pro – apoptotische Effekte konnten unter Silibinin und Novobiocin Therapie beobachtet werden (*Abbildung 15*). Zusammenfassend ist zu vermerken, dass die NCI – H295R Zelllinie deutlich verstärkte Apoptose zeigte unter Luminespib und Ganetespib Therapie als die MUC – 1 Zelllinie.

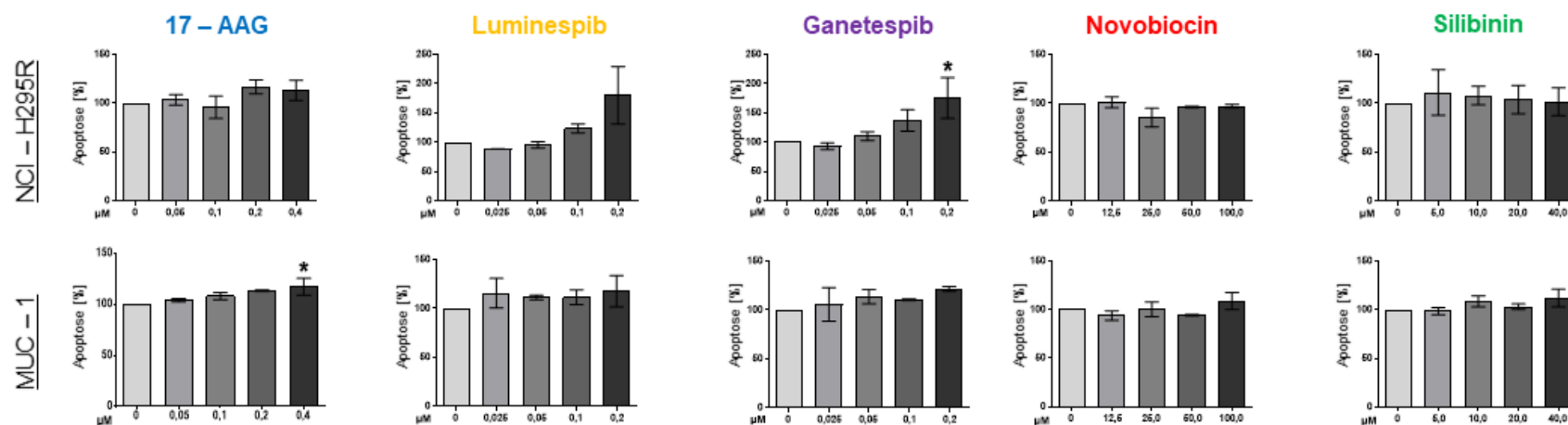


Abbildung 15: Effekte von HSP90 Inhibitoren auf die Apoptose

Untersuchung der apoptotischen Effekte von N – und C – terminalen HSP90 Inhibitoren nach 24 stündiger Behandlung von NCI – H295R und MUC – 1 Zellen.

5.3.4 Zellmigration

Der Einfluss der HSP90 Inhibitoren auf die Zellmigration wurde in NCI – H295R und MUC – 1 Zellen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die N – terminalen HSP90 Inhibitoren, Luminespib und Ganetespib, signifikante Effekte erzielten bei höherer (0,2 μ M) (*Abbildung 16 A*) und bei niedriger (0,01 μ M) (*Abbildung 16 B*) Konzentration in NCI – H295R Zellen. MUC – 1 Zellen reagierten nach 48 stündiger Behandlung mit Luminespib und Ganetespib (höhere Dosierung: 0,2 μ M) (*Abbildung 16 C*) mit einer signifikanten Reduktion der Zellmigration. Luminespib hatte auch bei niedrigerer Dosierung (0,01 μ M) (*Abbildung 16 D*) Auswirkungen auf die Zellmigration von MUC – 1 Zellen. Der anti – proliferative Wirkstoff Mitomycin C wurde mit einer 10,0 μ M Konzentration zu jeder Behandlung hinzugefügt, um gezielt Effekte auf die Zellmigration untersuchen zu können (*Abbildung 16*).

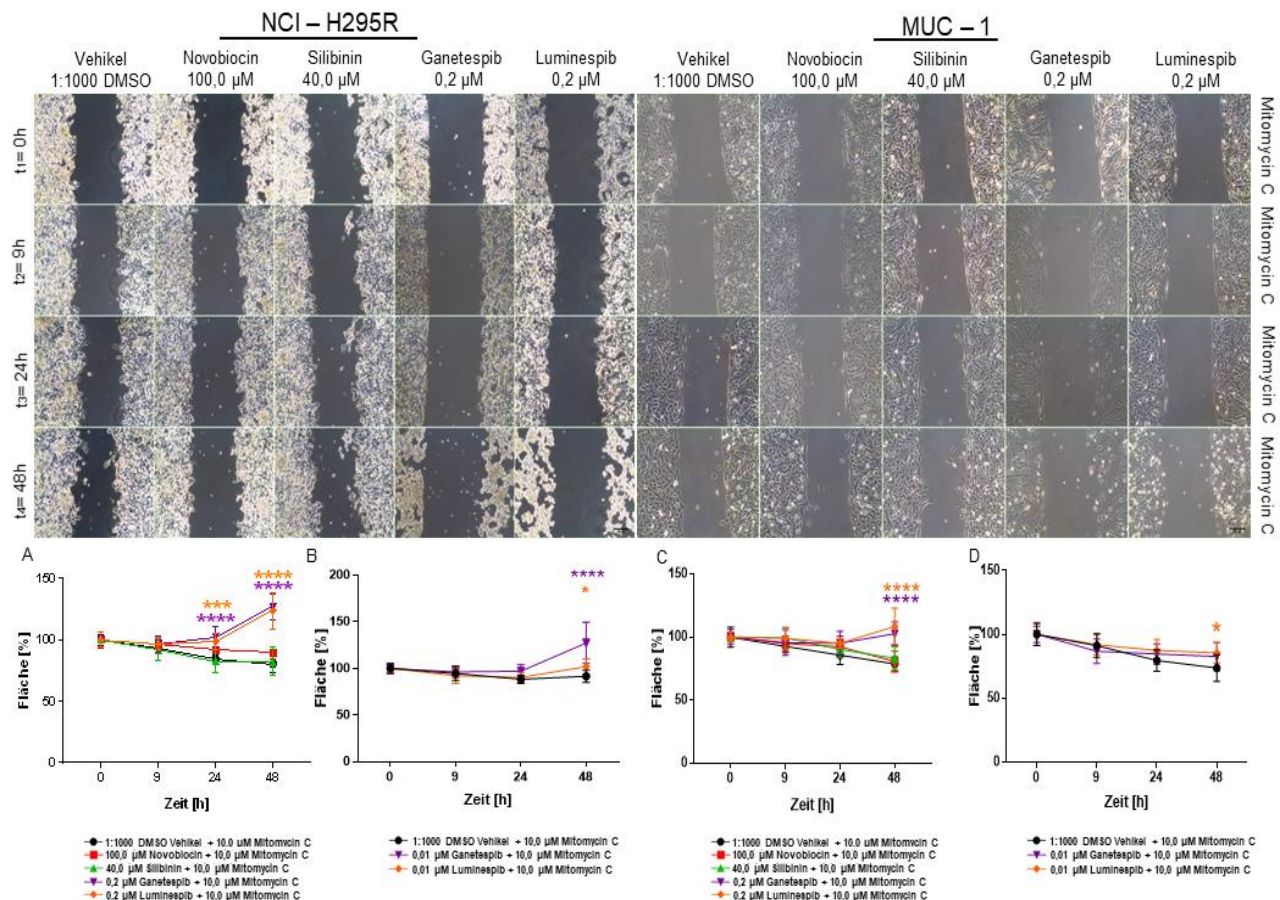


Abbildung 16: Effekte von HSP90 Inhibitoren auf die Zellmigration

Repräsentative Bilder zeigen den Einfluss der verwendeten N – und C – terminalen HSP90 Inhibitoren auf die Zellmigration. Signifikante Effekte auf die Zellmigration kann bei der Behandlung von NCI – H295R und MUC – 1 Zellen mit Luminespib (0,2 µM) und Ganetespib (0,2 µM) detektiert werden (A, C). Bei niedrigen Dosierungen zeigen Luminespib signifikante Wirkung in NCI – H295R (B) und MUC – 1 Zellen(D). Ganetespib wirkt bei niedriger Dosis nur in NCI – H295R Zellen (B). Die Messbalkenskala entspricht 200 µm.

5.4 Effekte von Luminespib und Ganetespib auf adrenale Primärkulturen

Anhand der vielversprechenden Ergebnisse der HSP90 Inhibitoren bei der Behandlung von NCI – H295R und MUC – 1 Zellen wurden Luminespib und Ganetespib in NNRK Primärkulturzellen getestet.

Es konnte nachgewiesen werden, dass in Lungen – und Zwerchfellmetastasen einer Patientin mit einem metastasierten Nebennierenrindenkarzinom eine signifikante Reduktion der Zellviabilität nach 72 stündiger Behandlungsdauer mittels Luminespib und Ganetespib Therapie erzielt werden konnte. (Lungenmetastase: 72 h 0,2 μ M L: 69,0% \pm 5,1% und 72 h 0,2 μ M G: 70,4% \pm 3,7% im Vergleich zur Vehikel behandelten Kontrollgruppe; Zwerchfellmetastase: 72 h 0,2 μ M L: 46,0% \pm 5,8% und 72 h 0,2 μ M G: 43,9% \pm 2,7% im Vergleich zur Vehikel behandelten Kontrollgruppe) (Abbildung 17).

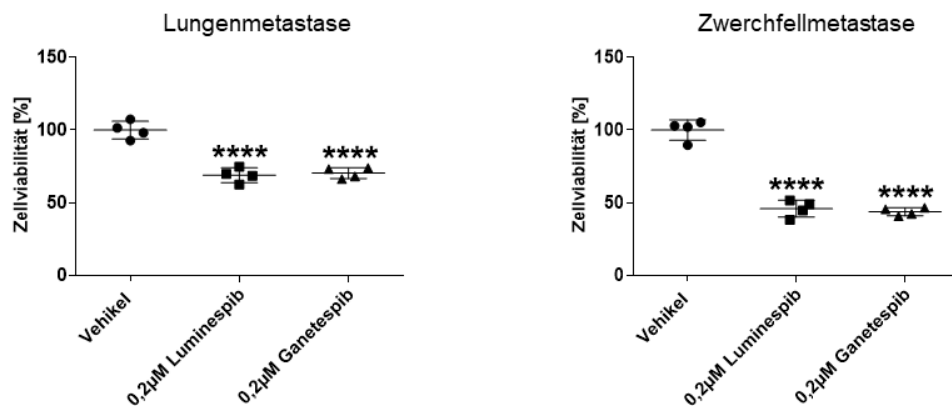


Abbildung 17: Zellviabilität Primärkultur

Analyse der Zellviabilität in Primärkulturzellen von Metastasen eines Nebennierenrindenkarzinoms. 0,2 μ M Luminespib und 0,2 μ M Ganetespib zeigen, im Vergleich zu Vehikel behandelten Zellen, signifikante anti – tumorale Effekte nach 72 stündiger Behandlung.

5.5 Effekte von HSP90 Inhibitoren und Wirkstoffen des EDP – M Schemas auf NNRK Zelllinien

5.5.1 Bestimmung des Behandlungszeitpunktes und des Konzentrationsbereiches der Wirkstoffe des EDP – M Schemas

Doxorubicin, Etoposid, Cisplatin und Mitotane wurden in NCI – H295R und MUC – 1 Zellen in einem breiten Konzentrationsbereich und zu verschiedenen Zeitpunkten getestet.

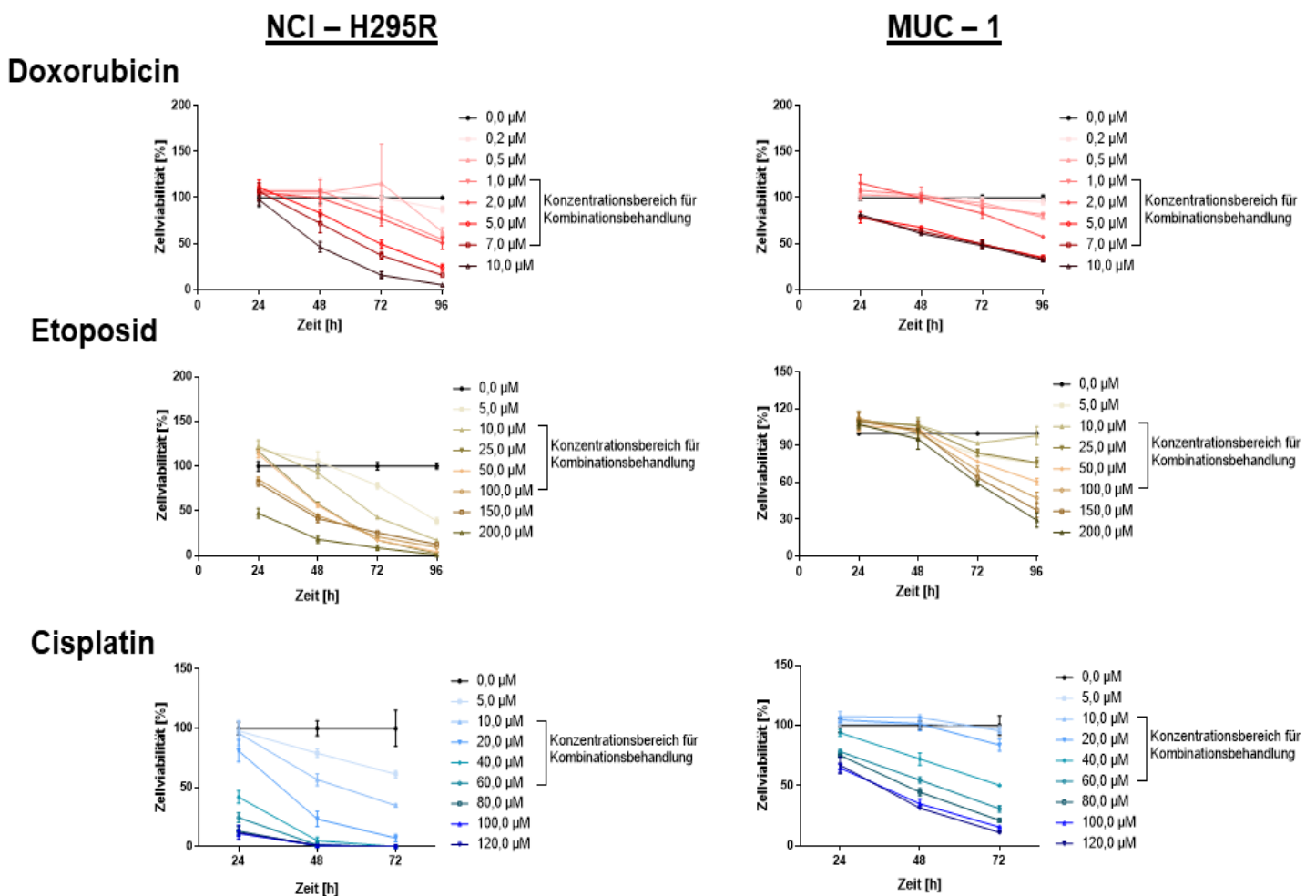


Abbildung 18: Effekte von Etoposid, Doxorubicin und Cisplatin auf die Zellviabilität

Bestimmung des Behandlungszeitpunktes sowie des Konzentrationsbereiches von EDP in NCI – H295R und MUC – 1 Zellen für die Kombinationsbehandlung mit HSP90 Inhibitoren.

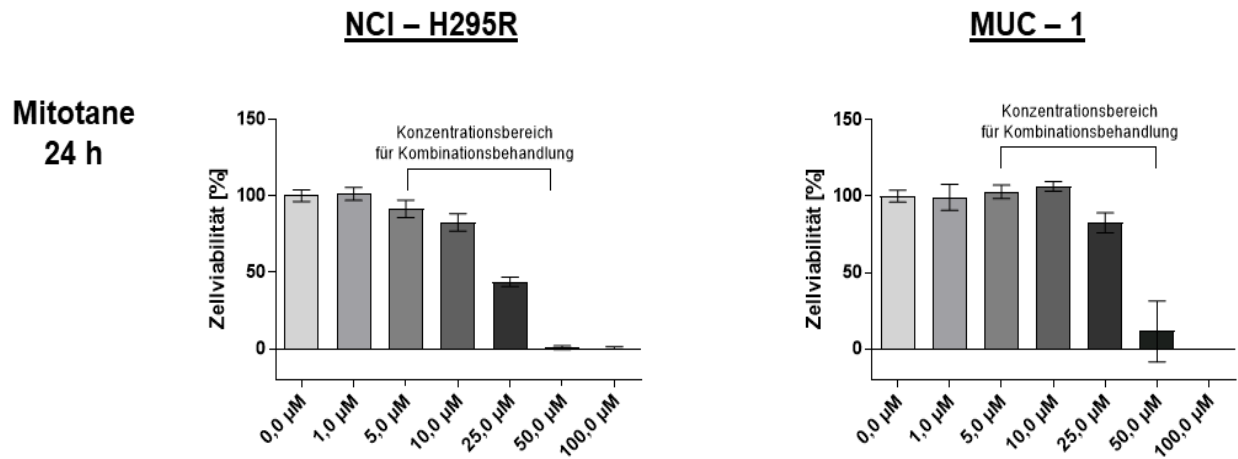


Abbildung 19: Effekte von Mitotane auf die Zellviabilität

Bestimmung des Behandlungszeitpunktes sowie des Konzentrationsbereiches von Mitotane in NCI – H295R und MUC – 1 Zellen für die Kombinationsbehandlung mit HSP90 Inhibitoren.

Es wurde anhand dieser Vorexperimente der entsprechende Kombinationsbehandlungszeitpunkt sowie der Konzentrationsbereich von EDP – M für die Kombinationsbehandlung mit HSP90 Inhibitoren ermittelt (*Abbildung. 18 und 19*). Hierbei ergaben sich zum Teil unterschiedlich Kombinationsbehandlungskonditionen für NCI – H295R und für MUC – 1 Zellen (*Tabelle 14*).

5.5.2 Kombinationsbehandlung von HSP90 Inhibitoren mit Bestandteilen des EDP – M Schemas

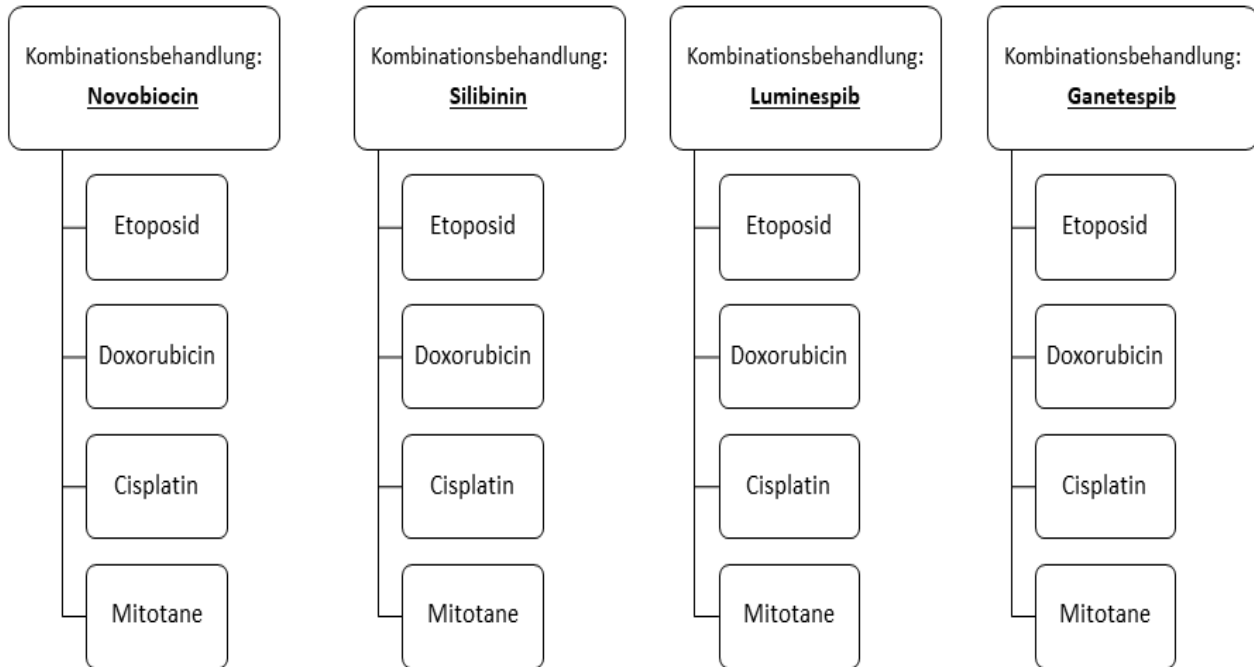


Abbildung 20: Kombinationsbehandlungsstrategien

Übersicht über die Kombinationsbehandlungsstrategien in NNRK Zelllinien mit Anteilen des EDP – M Schemas zusammen mit HSP90 Inhibitoren.

Signifikante Effekte waren in NCI – H295R Zellen bei niedrigen Dosierungen von Doxorubicin und Ganetespib und bei leicht höherer Dosierung von Doxorubicin zusammen mit Luminespib bei dem gewählten Behandlungszeitpunkt zu vermerken. Etoposid zeigte zur ausgewählten Behandlungszeit in NCI – H295R bei niedriger Dosierung eine Wirkungssteigerung zusammen mit niedrig dosiertem Ganetespib beziehungsweise niedrig dosiertem Luminespib (*Abbildung 21 A*). MUC – 1 Zellen reagierten auch mit einer Wirkungsverstärkung bei den gleichen Kombinationsbehandlungen wie in NCI – H295R Zellen. Jedoch war der kombinierte Effekt in MUC – 1 Zellen wesentlich schwächer ausgeprägt im Vergleich zu NCI – H295R Zellen (*Abbildung 21 B*).

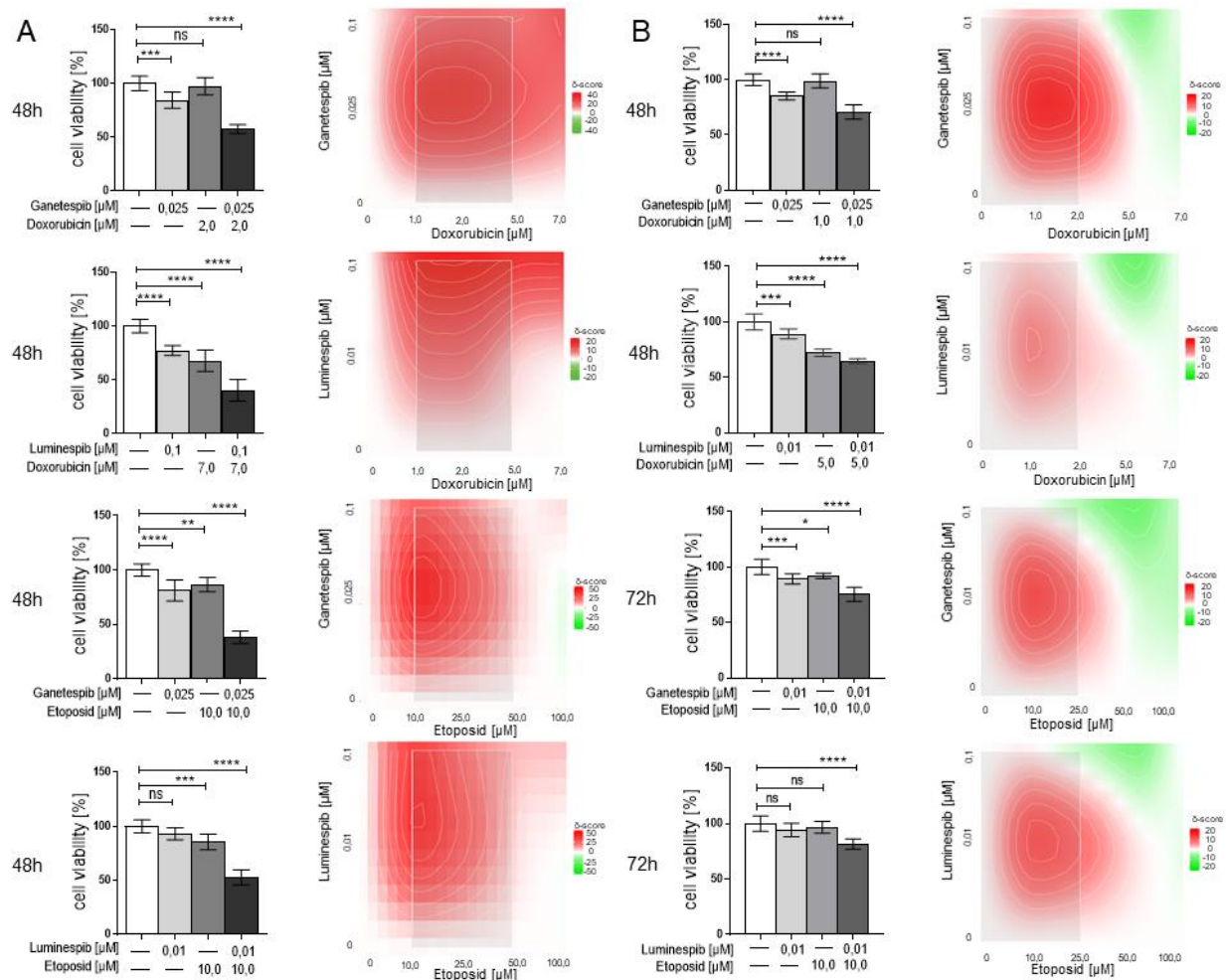


Abbildung 21: Auswirkung der Kombinationsbehandlungen auf die Zellviabilität [1]

Analyse der Auswirkung von HSP90 Inhibitoren und der Wirkstoffe des EDP – M Schemas auf die Zellviabilität von NCI – H295R (A) und MUC – 1 (B) Zellen.

Sowohl Cisplatin als auch Mitotane zeigten zusammen mit den verwendeten HSP90 Inhibitoren (Luminespib, Ganetespib, Novobiocin und Silibinin) keine wesentlichen beziehungsweise therapeutisch relevanten Wirkungsverstärkungen in NCI – H295R (Abbildung 22) und MUC – 1 Zellen (Abbildung 23) in dem gewählten Konzentrationsbereich und zu den ausgewählten Behandlungszeitpunkten. Zusätzlich wurden zum Teil sehr hohe Konzentrationen von Cisplatin und Mitotane verwendet und somit wäre auch mit einem ungünstigeren Nebenwirkungsprofil zu rechnen. Die verwendeten C – terminalen HSP90 Inhibitoren konnten auch in der Kombinationsbehandlung mit Etoposid beziehungsweise Doxorubicin keine therapeutisch relevanten anti – tumoralen Effekte in NCI – H295R (Abbildung 24)

und MUC-1 Zellen (Abbildung 25) zeigen. Hier konnten teilweise nur in einzelnen Konzentrationsbereichen ein zusätzlicher Effekt bei der Kombinationsbehandlung beobachtet werden.

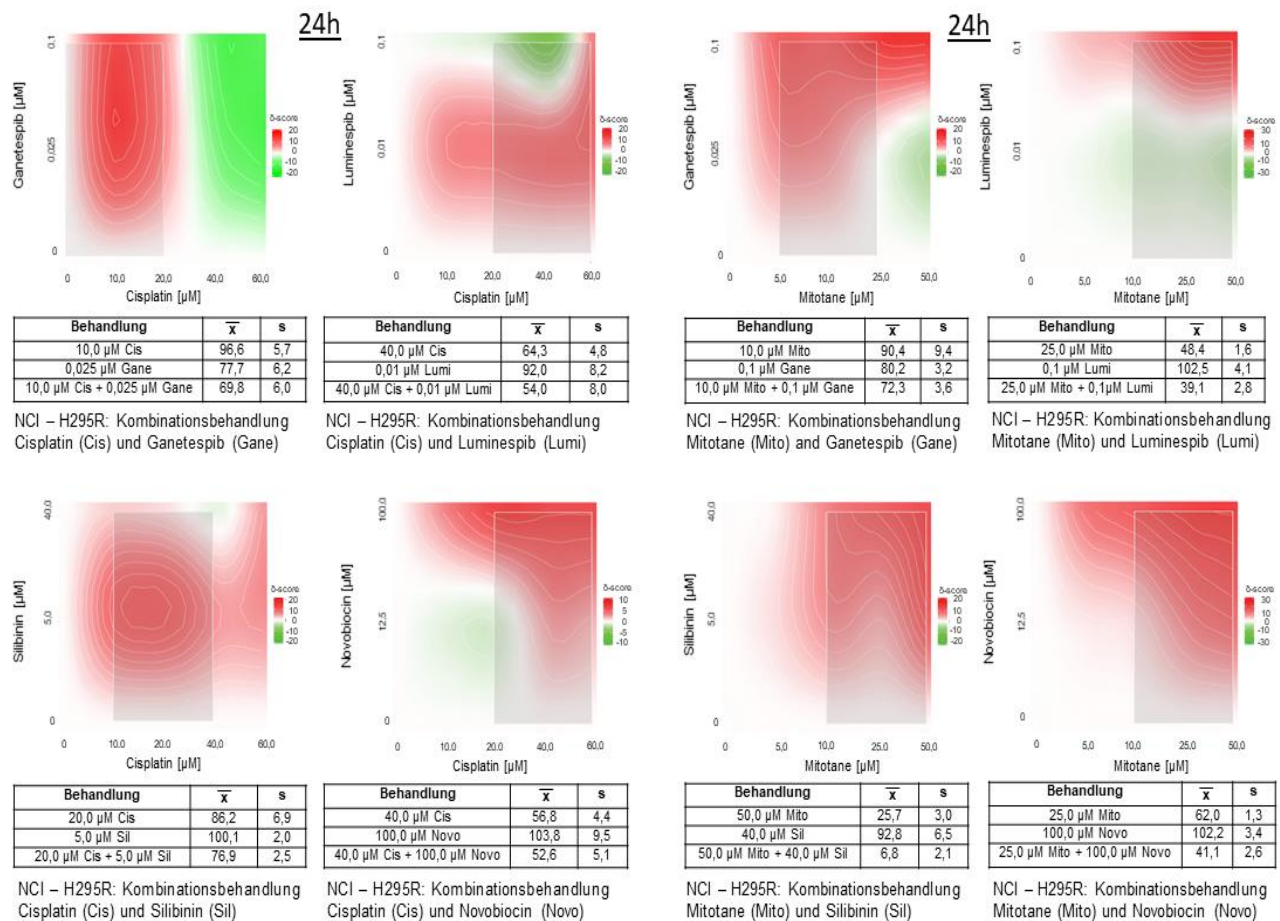


Abbildung 22: Auswirkung der Kombinationsbehandlung auf die Zellviabilität [2]

Effekte der Behandlung auf die Zellviabilität von NCI – H295R Zellen durch die Therapie mit HSP90 Inhibitoren zusammen mit Cisplatin und Mitotane.

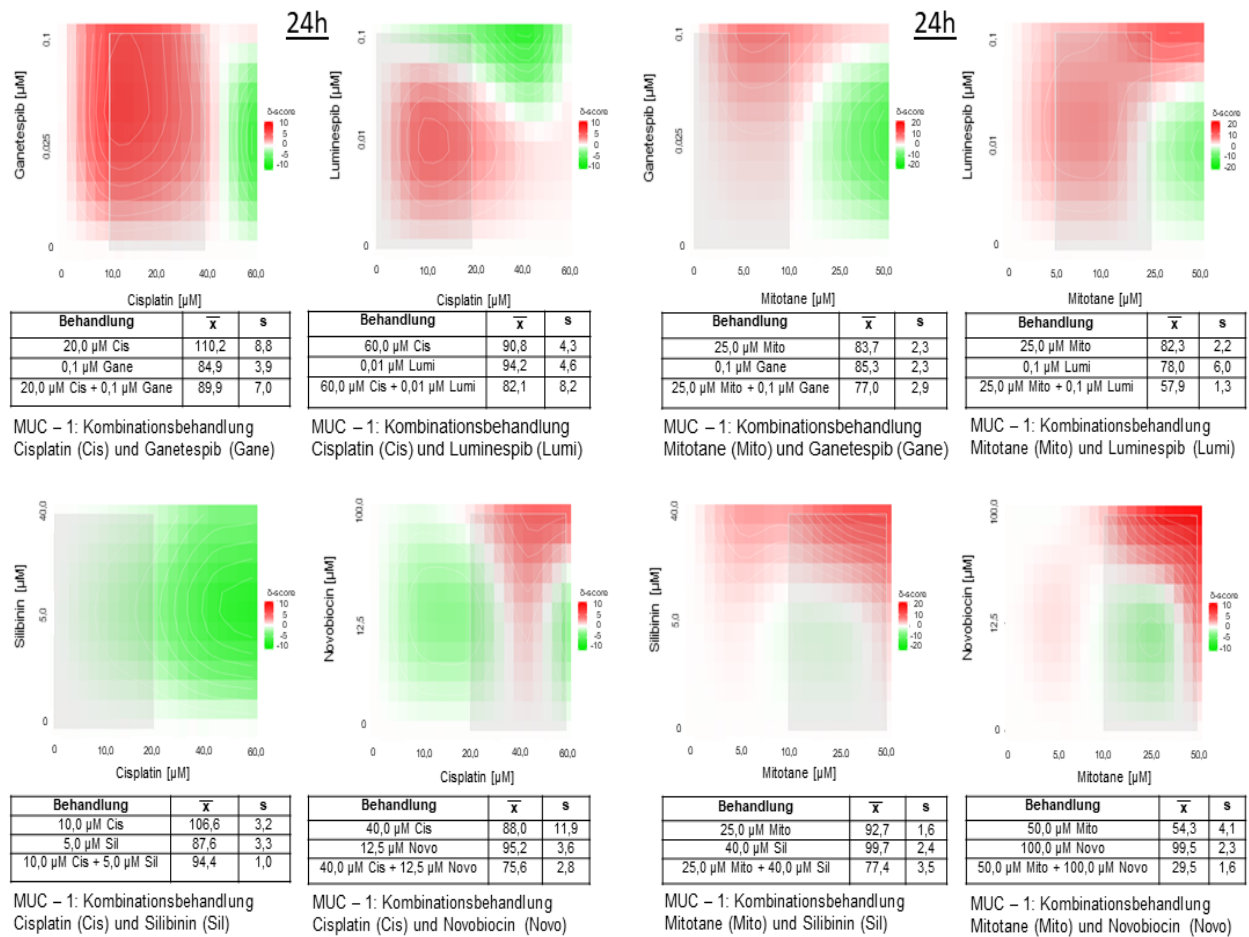


Abbildung 23: Auswirkung der Kombinationsbehandlung auf die Zellviabilität [3]

Effekte der Behandlung auf die Zellviabilität von MUC – 1 Zellen durch die Therapie mit HSP90 Inhibitoren zusammen mit Cisplatin und Mitotane.

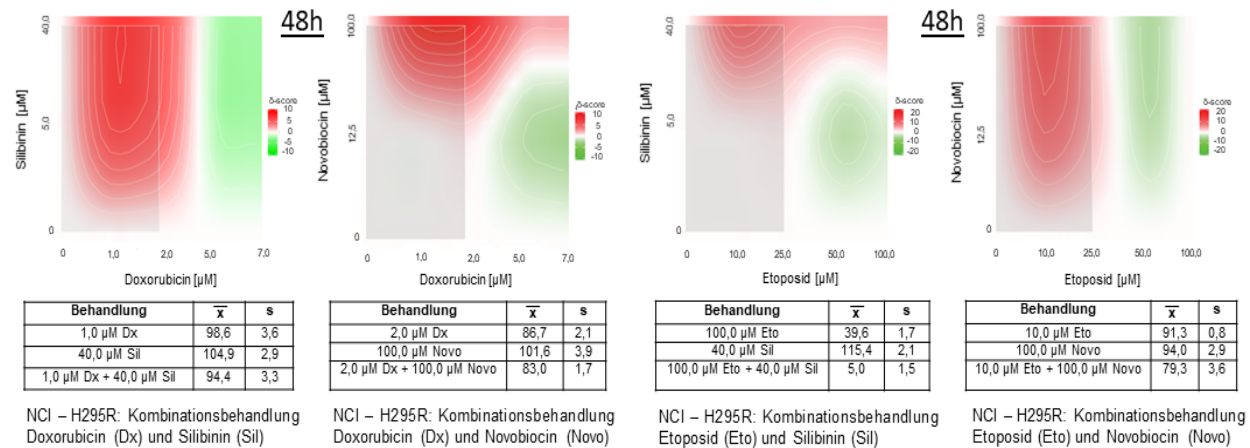


Abbildung 24: Auswirkung der Kombinationsbehandlung auf die Zellviabilität [4]

Effekte der Behandlung auf die Zellviabilität von NCI – H295R Zellen durch die Therapie mit Silibinin und Novobiocin zusammen mit Doxorubicin und Etoposid.

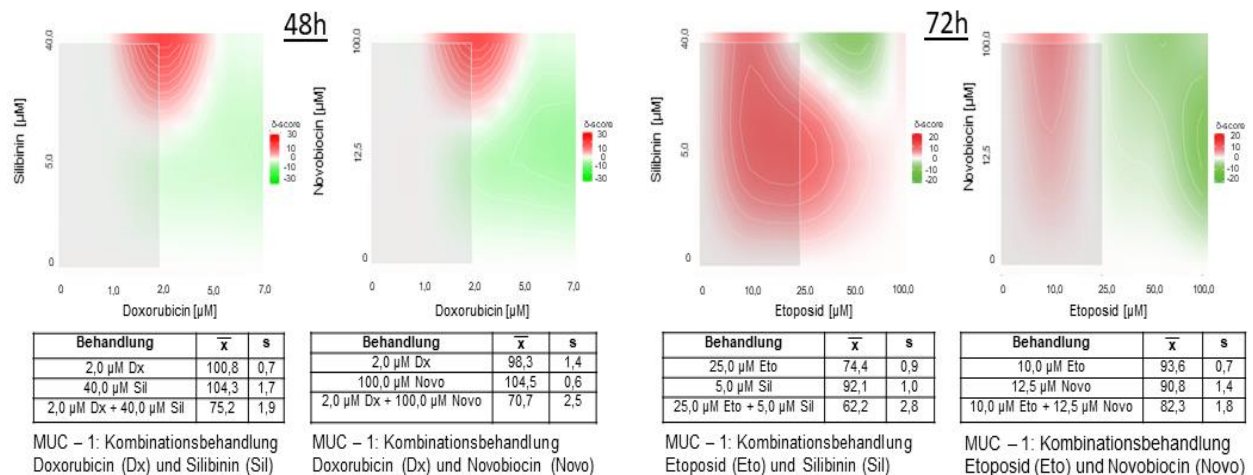


Abbildung 25: Auswirkung der Kombinationsbehandlung auf die Zellviabilität [5]

Effekte der Behandlung auf die Zellviabilität von MUC – 1 Zellen durch die Therapie mit Silibinin und Novobiocin zusammen mit Doxorubicin und Etoposid.

5.6 Einfluss der HSP90 Inhibitoren auf zelluläre Signalkaskaden

Die anti – tumoralen Effekte der verwendeten N – terminalen HSP90 Inhibitoren in zwei Zelllinien des NNRK zeigten eine vielversprechende Wirkungsweise und stellen somit eine potentielle Therapieoption für das NNRK dar. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden entsprechende Signalkaskaden analysiert, welche eine entscheidende Rolle bei der Tumorentwicklung spielen und welche mit HSP90 Inhibitoren interagieren könnten. Der Fokus dieser Arbeit lag auf den ERK1/2 („extracellular regulated kinases“) und auf den AKT (Proteinkinase B) Signalweg. Nach 48 stündiger Behandlung von NCI – H295R und MUC – 1 Zellen mit HSP90 Inhibitoren konnte eine Reduktion der aktivierten Form von cRAF und der aktivierten Form von MEK1/2 unter Luminespib und Ganetespib Behandlung vernommen werden. Interessanterweise konnte aber nur in MUC – 1 Zellen eine Abnahme von p – ERK1/2 und weiteren folgenden Proteinstrukturen des ERK1/2 Signalweges nach Luminespib und Ganetespib Therapie detektiert werden. NCI – H295R Zellen reagierten mit keiner Reduktion der aktivierten Form von ERK1/2 unter Luminespib und Ganetespib Behandlung (*Abbildung 26 A*).

Mittels Immunfluoreszenzfärbung konnte die Abnahme von p – ERK1/2 in MUC – 1 Zellen nochmals untermauert werden (*Abbildung 26 B und 26 C*). Die verwendeten C – terminalen HSP90 Inhibitoren zeigten in keinen der beiden Zelllinien eine Auswirkung auf den ERK1/2 sowie auf den AKT Signalweg (*Abbildung 26 A*).

Weitere Untersuchungen des AKT Signalweges ergaben, dass sowohl in NCI – H295R als auch in MUC – 1 Zellen unter Luminespib und Ganetespib Therapie eine Abnahme der aktivierten Form von AKT und eines nachfolgenden Proteins (mTOR) nachgewiesen werden konnte (*Abbildung 26 A*).

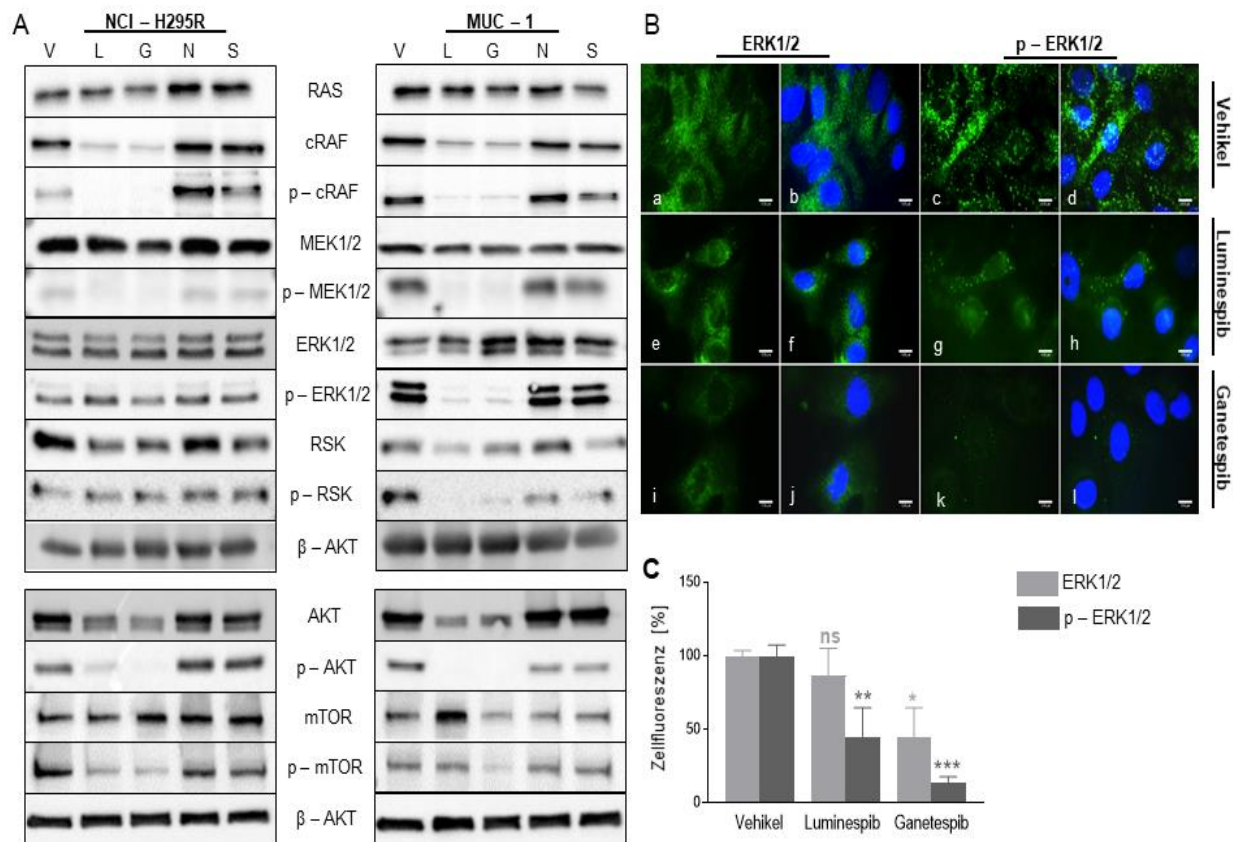


Abbildung 26: Einfluss der HSP90 Inhibitoren auf den ERK1/2 und AKT Signalweg

Untersuchung der Auswirkung der HSP90 Inhibitoren auf den ERK1/2 und AKT Signalkaskadeweg in zwei Nebennierenkarzinomzelllinien (A). Repräsentative Immunfluoreszenzbilder zeigen eine deutliche Reduktion von p-ERK1/2 in MUC-1 Zellen unter Luminespib und Ganetespib Therapie (B, C). Abkürzungen: Vehikel (V): 1:1000 DMSO; Luminespib (L): 0,2 μ M; Ganetespib (G): 0,2 μ M; Novobiocin (N): 100,0 μ M; Silibinin (S): 40,0 μ M. Die Behandlungsdauer beträgt jeweils 48 h. Die Messbalkenskala ist mit 12,5 μ m beschriftet.

5.7 Effekte einer HSP90 Inhibition auf die Steroidbiosynthese

Der Einfluss der HSP90 Inhibitoren auf die Kortisolsekretion wurde in NCI – H295R und MUC – 1 Zellen untersucht. Nach 6 stündiger Behandlungsdauer zeigten in NCI – H295R Zellen Novobiocin, Silibinin und Ganetespib signifikante Effekte auf die Kortisolsekretion in Unabhängigkeit zur Zellviabilität. Luminespib und 17 – AAG zeigten erst nach 24 stündiger Therapie signifikante Effekte in NCI – H295R Zellen (*Abbildung 27*). Aufgrund der schwächeren Steroidsynthese in MUC – 1 Zellen konnten in dieser Zelllinie kein Einfluss der HSP90 Inhibition auf die Kortisolsekretion nachgewiesen werden.

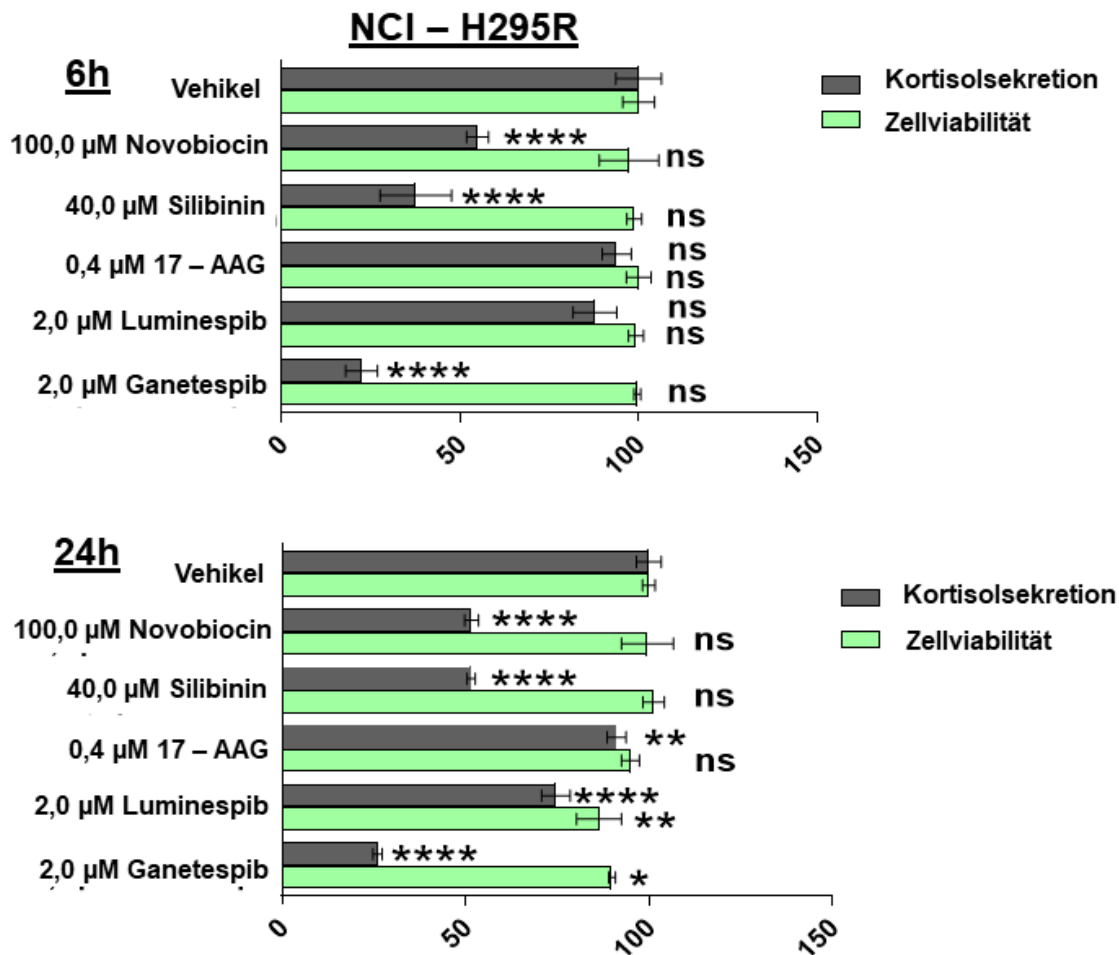


Abbildung 27: Auswirkung der HSP90 Inhibition auf die Kortisolsekretion

Nach 6 und 24 stündiger Behandlung mit HSP90 Inhibitoren im nicht bzw. leicht toxischem Bereich zeigen NCI – H295R Zellen eine signifikante Reduktion der Kortisolsekretion.

6. Diskussion

6.1 Expression von HSP90 und GR in NNRK Zelllinien

Arbeiten der letzten Jahrzehnte haben gezeigt, dass das NNRK eine sehr heterogene Tumorerkrankung darstellt und präklinische Modelle sehr rar sind. Diese Vielschichtigkeit zeigte sich vor allem im genetisch – molekularem Profil, der Hormonaktivität und dem proliferativen Potential [30, 44, 50, 51]. Es wurde im Zusammenhang mit dieser Arbeit festgestellt, dass HSP90 β höher exprimiert ist in NNRK verglichen zu anderen Tumoren der Nebennierenrinde (nicht – funktionellen Adenomen; Adenomen, die autonom Kortisol produzieren; Cushing Syndrom und Nebennierenrindenkarzinom). Wir konnten zudem zeigen, dass niedrig exprimiertes HSP90 β innerhalb des NNRK mit einer schlechteren Prognose korreliert [140]. Eine veränderte Expression von HSP90 wurde auch bereits in anderen Tumorarten, beispielsweise in Brustkrebs, beschrieben [78]. Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen bezüglich Expression und Lokalisierung der zwei Hauptisoformen des HSP90 Moleküls zeigten, dass sowohl HSP90 α/β als auch HSP90 β in NCI – H295R und MUC – 1 Xenograftgewebe vorhanden waren (*Ergebnisteil 5.1 Abbildung 8 und 9*). Hierbei ist zu bemerken, dass die Expression von HSP90 α/β als auch die Expression von HSP90 β stärker in MUC – 1 als in NCI – H295R Xenograftgewebe vorzufinden war. Wie bereits in der Literatur beschrieben [72], konnte auch für die verwendeten Nebennierenrindenkarzinomzelllinien, NCI – H295R und MUC – 1, eine zytoplasmatische Lokalisierung der konstitutiv exprimierten HSP90 β Isoform und eine zytoplasmatische sowie nukleare Lokalisierung von HSP90 α/β gezeigt werden (*Ergebnisteil 5.1 Abbildung 10*). Zusammengenommen deuten diese Untersuchungen darauf hin, dass HSP90 in Nebennierenrindentumoren sowie in NNRK Xenograftgeweben exprimiert ist und im NNRK einen prognostischen Einfluss hat. Daher stellt HSP90 ein potentielles Target für die Therapie des Nebennierenrindenkarzinoms dar.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von NCI – H295R und MUC – 1 Zellen mittels HSP90 Inhibitoren bei einer Behandlungsdauer von 48 h (0,2 μ M Luminespib / Ganetespib; 100,0 μ M Novobiocin; 40,0 μ M Silibinin) die Expression der zwei Hauptisoformen des HSP90 Moleküls nicht veränderte. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass durch eine HSP90 Inhibition nicht das Target degradiert, sondern dessen Funktion, wie beispielsweise die korrekte Faltung der Client Proteine, inhibiert wird (*Ergebnisteil 5.2 Abbildung 11*). Bei diesen Untersuchungen wurde der N – terminale HSP90 Inhibitor der ersten Generation,

17 – AAG, nicht verwendet, da dieser in den zusätzlich durchgeführten anti – tumoralen Assays bereits keine vielversprechende Wirkung in den behandelten NNRK Zelllinien im Vergleich zu Luminespib und Ganetespib zeigte.

In der Literatur konnte bereits für andere Tumorarten, beispielsweise in Hypophysentumorzellen, gezeigt werden, dass unter HSP90 Inhibitor Behandlung die Expression der HSP90 Isoformen unverändert blieb beziehungsweise nicht reduziert worden war („heat shock response“) [83, 141-143]. Hingegen konnten durch meine Untersuchungen gezeigt werden, dass der GR, welcher ein Client Protein von HSP90 darstellt, durch die verwendeten N – terminalen HSP90 Inhibitoren, Luminespib und Ganetespib, weniger in NCI – H295R und MUC – 1 Zellen exprimiert wurde (*Ergebnisteil 5.2 Abbildung 12*). Interessanterweise zeigten die verwendeten C – terminalen HSP90 Inhibitoren, Novobiocin und Silibinin, keinen Effekt auf die Expression des GR. Hierbei ist aber anzumerken, dass die Western Blot Analyse eine Aussage bezüglich des Vorhandenseins des GR unter HSP90 Inhibition gibt. Über die Funktionsfähigkeit des GR kann dagegen keine Aussage getroffen werden. Somit besteht auch die Möglichkeit, dass der GR zwar unter Novobiocin und Silibinin nicht degradiert wird, aber die Funktionsfähigkeit des GR trotzdem verändert sein könnte. Ähnliche Beobachtungen bezüglich der GR Expression konnten mittels des N – terminalen HSP90 Inhibitors 17 – AAG und Novobiocin sowie Silibinin in AtT – 20 Zellen (Hypophysentumorzelllinie der Maus) gemacht werden [83]. Hier konnte eine Reduktion eines Hyperkortisolismus´ unter C – terminaler HSP90 Inhibition erzielt werden, da aufgrund der Hemmung des HSP90 mehr ungebundener GR vorliegt. Die Thematik GR und Kortisolsekretion wird unter den Abschnitt 6.5 nochmals ausführlicher besprochen.

6.2 Anti – tumorale Effekte der verwendeten N – terminalen HSP90 Inhibitoren in zwei NNRK Zelllinien

Die vorliegende Arbeit enthält Anhaltspunkte, dass eine HSP90 Inhibition eine wirksame Behandlungsmöglichkeit für das NNRK darstellen könnte. Im Besonderen zeigten die verwendeten N – terminalen HSP90 Inhibitoren der späteren Generation, Luminespib und Ganetespib, starke anti – tumorale Effekte in NCI – H295R und MUC – 1 Zellen. Da die N – terminalen HSP90 Inhibitoren kompetitiv an die ATP – Bindungsstelle des HSP90 Moleküls binden und somit direkt mit ATP konkurrieren, wird unter HSP90 Inhibition die Energieversorgung des HSP90 Moleküls nicht optimal stattfinden können, wodurch die korrekte Faltung überlebensnotwendiger Client Proteine beeinträchtigt wird [85, 98-100].

Tatsächlich konnten bereits nach 24 stündiger Behandlungsdauer unter Luminespib und Ganetespib Therapie signifikante Effekte bei der Zellviabilität von NCI – H295R und MUC – 1 Zellen detektiert werden (*Ergebnisteil 5.3.1 Abbildung 13*). Wie aus der Literatur bereits bekannt war, zeigten in anderen Tumorentitäten, beispielsweise in Blasenkrebs, N – terminale HSP90 Inhibitoren der späteren Generation eine Reduktion der Zellviabilität in präklinischen Untersuchungen [144]. Interessanterweise reagierten die Zellen mit geringerer Expression von HSP90 (NCI – H295R Zellen) stärker auf die Behandlung mit Luminespib oder Ganetespib bezüglich der Zellviabilität. Das kann möglicherweise daran liegen, dass die MUC – 1 Zellen, aufgrund der stärkeren Expression von HSP90 auch mehr Kompensationsmechanismen aufweisen, um die Therapie mittels HSP90 Inhibitoren zu umgehen, da die durch die Therapie induzierte „heat shock response“ vermehrt stattfinden kann [65, 121, 145]. Interessanterweise reagierten die MUC – 1 Zellen als einzige verwendete Zelllinie mit einer Reduktion der Zellviabilität auf die Behandlung mittels 17 – AAG. In NCI – H295R Zellen war 17 – AAG hingegen unwirksam in der ausgewählten Dosis und dem ausgewählten Behandlungszeitrahmen. Diese Beobachtung ist ein weiteres Indiz für die Heterogenität dieser Tumorentität. Insgesamt zeigten die vorliegenden Untersuchungen, dass für die Behandlung des NNRK die N – terminalen HSP90 Inhibitoren der neueren Generation effektivere Wirkstoffe zu sein scheinen. Des Weiteren ist anzumerken, dass die verwendeten C – terminalen HSP90 Inhibitoren, Novobiocin und Silibinin, keinen Einfluss auf die Zellviabilität sowohl in NCI – H295R als auch in MUC – 1 Zellen zeigten (*Ergebnisteil 5.3.1 Abbildung 13*).

Eine Verminderung der Zellproliferation konnte analog zur Zellviabilität unter Luminespib und Ganetespib Therapie in NCI – H295R und MUC – 1 erreicht werden (*Ergebnisteil 5.3.2 Abbildung 14*). Jedoch waren pro – apoptotische Tendenzen sowie Signifikanzen nur unter N – terminaler HSP90 Inhibitor Behandlung, Luminespib und Ganetespib, in NCI – H295R Zellen zu detektieren. Hingegen waren in MUC – 1 Zellen schwache (17 – AAG) bis gar keine apoptotischen Wirkungen zu erkennen und somit wieder eine andere Reaktion als in NCI – H295R Zellen auf die HSP90 Inhibitor Therapie zu verzeichnen (*Ergebnisteil 5.3.3 Abbildung 15*). Interessanterweise reagierte die Zelllinie, welche aus einer Metastase gewonnen und die bereits mit EDP – M behandelt wurde (MUC-1) [44], offensichtlich mit einer allgemeinen schwächeren Wirkeffizienz auf die Behandlung mit HSP90 Inhibitoren als die NCI – H295R Zellen. Dieser unterschiedliche Behandlungserfolg in den verwendeten NNRK Zelllinien wurde auch bereits in der Literatur bezüglich des EDP – M und LEDP – M Behandlungsschemas beobachtet [44]. Somit kann geschlussfolgert werden, dass eine patientenindividuelle Therapie auch im NNRK erstrebenswert ist. Trotz des relativ schlechten Abschneidens der verwendeten C – terminalen HSP90 Inhibitoren in den von mir durchgeführten

anti – tumoralen Experimenten ist an dieser Stelle darauf hinzuweisen, dass Silibinin bereits gute Resultate beispielsweise bei der präklinischen Behandlung der AtT – 20 Hypophysentumorzelllinie, in Kolonkarzinomzellen und in präklinischen Untersuchungen von Prostatatumoren erzielen konnte [83, 146, 147]. Bei hochmalignen Tumoren sind, parallel zur anti – tumoralen Wirkung der Wirkstoffe, auch die Effekte der Inhibitoren auf die Zellmigration ein wichtiger Untersuchungspunkt, da das Metastasierungsvermögen auch von dieser Zelleigenschaft abhängig ist. Ein weiterer Gesichtspunkt war daher die Untersuchung der HSP90 Inhibitoren auf die Zellmigration von NCI – H295R und MUC – 1 Zellen. Hier konnte erneut gezeigt werden, dass Luminespib und Ganetespib sehr effizient sogar im niedrig mikromolaren Bereich vor allem in NCI – H295R Zellen waren. Jedoch wurde eine schwächere Wirkung auf die Zellmigration der MUC – 1 Zellen unter Luminespib und Ganetespib Therapie beobachtet. Um einen Effekte auf die Zellmigration der MUC – 1 Zellen zu erzielen, war eine höhere Wirkstoffkonzentration notwendig (*Ergebnisteil 5.3.4 Abbildung 16*). Diese Beobachtungen bestätigen wiederum die bessere Ansprechrate der NCI – H295R Zellen besonders auf die N – terminalen HSP90 Inhibitoren. Interessanterweise konnten im Allgemeinen keine Hemmung der Zellmigration bei der höchst verwendeten Dosierung von Novobiocin und Silibinin gesehen werden, welches wiederum analog zu den anderen in dieser Arbeit beobachteten anti – tumoralen Effekten war.

Nach Austestung der HSP90 Inhibitoren in den vorhandenen Zelllinien wurden die hier wirksamsten N – terminalen HSP90 Inhibitoren, Luminespib und Ganetespib, in Primärkulturen von Lungen – und Zwerchfellmetastasen von einem Patienten mit NNRK untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die angewandten HSP90 Inhibitoren hoch signifikante Effekte auch auf die Primärkulturzellen zeigten (*Ergebnisteil 5.4 Abbildung 17*). Dieses Experiment spiegelte zwar letztendlich nur die Behandlungseffektivität von Luminespib und Ganetespib bei einem NNRK Patienten wider, war aber eine zusätzliche Untermauerung der bereits gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der anti – tumoralen Wirkungsweise der N – terminalen HSP90 Inhibitoren.

In der Klinik werden aktuell Patienten mit einem inoperablen NNRK mittels einer Wirkstoffkombination aus drei Zytostatika, Etoposid, Doxorubicin und Cisplatin sowie mit der adrenolytischen Substanz Mitotane behandelt [15, 16]. Unglücklicherweise konnten derzeitige Untersuchungen von den HSP90 Inhibitoren BIIB021 und CCT18159 zusammen mit Mitotane bei der Behandlung des NNRK keine relevanten synergistischen Effekte zeigen [138]. In der vorliegenden Arbeit wurden, ergänzend zu den Einzelbehandlungen, auch vier der fünf HSP90

Inhibitoren für eine Kombinationsbehandlung mit den Wirkstoffen des EDP – M Schemas verwendet. Hierfür wurde 17 – AAG ausgeschlossen, da damit lediglich eine geringe anti – tumorale Wirkung in den Einzelbehandlungen und dies vor allem in MUC – 1 Zellen erzielt werden konnte. Um den konkreten Behandlungszeitpunkt und Konzentrationsbereich für die Kombinationsbehandlung zu bestimmen, wurden die Wirkstoffe des EDP – M Schemas zuerst als Einzeldosierung in NCI – H295R und MUC – 1 Zellen getestet (*Ergebnisteil 5.5.1 Abbildung 18 und 19*). Als Ausgangspunkt wurden Konzentrationsbereiche gewählt, wie sie bereits in der Literatur beschrieben worden waren [148-151]. Anhand dieser Vorexperimente wurde der Ablauf der Kombinationsbehandlung strukturiert. Mitotane zeigte bereits als Einzeldosis starke Effekte in beiden verwendeten Zelllinien zu einem frühen Behandlungszeitpunkt. Obwohl auch hier die NCI – H295R Zellen schon bei niedrigerer Dosis auf die Behandlung ansprachen, waren die kombinierten Behandlungseffekte von HSP90 Inhibitoren (Luminespib, Ganetespib, Silibinin, Novobiocin) zusammen mit Mitotane in NCI – H295R Zellen nicht sehr ausgeprägt. Bei höheren Konzentrationen von Mitotane (25 μ M bzw. 50 μ M) konnten eine leichte Wirkungsverstärkung unter der Kombinationsbehandlung verzeichnet werden (*Ergebnisteil 5.5.2 Abbildung 22*). Hierbei ist anzumerken, dass die verwendeten C – terminalen HSP90 Inhibitoren (Silibinin und Novobiocin) sogar eine bessere Wirkungsverstärkung zeigten als beispielsweise bei der Kombination Mitotane mit Luminespib oder Ganetespib. Eine mögliche Begründung hierfür kann sein, dass die C – terminalen HSP90 Inhibitoren erst ihre eigene Wirkung ausüben, wenn die Zellen bereits vorgeschädigt sind und somit die Wirkung vor allem in Kombination mit anderen Wirkstoffen sichtbar wird [152-155]. Darüber hinaus ist anzumerken, dass Mitotane als Einzelbehandlung schon starke Effekte zeigte (*Ergebnisteil 5.5.1 Abbildung 19*). In MUC – 1 konnten ähnliche Beobachtungen wie bei NCI – H295R Zellen bei der Kombination HSP90 Inhibitor mit Mitotane gezeigt werden (*Ergebnisteil 5.5.2 Abbildung 23*). Im Allgemeinen ist zu vermerken, dass eine kombinierte Wirkungsverstärkung nur bei bestimmten Konzentrationen und Zeitpunkten zu beobachten war. Wurde Mitotane jedoch zu hoch dosiert, dann war die Eigenwirkung zu stark um einen Zusatzeffekt mittels HSP90 Inhibition zu erzielen. Des Weiteren beschränkten sich die Aussagen auf den gewählten Konzentrationsbereich und Behandlungszeitpunkt. Wie sich eine Kombination der Wirkstoffe bei anderen Konzentrationen und Zeitpunkten verhält, bleibt hingegen offen.

Eine Kombination aus HSP90 Inhibitor und Cisplatin ergab keine deutliche Reduktion bezüglich der Zellviabilität in NCI – H295R und MUC – 1 Zellen (*Ergebnisteil 5.5.2 Abbildung 22 und 23*). Hier waren auch zum Teil sehr hohe Konzentrationen von Cisplatin notwendig, um eine additive

Wirkung zu erzielen. Jedoch sind diese Effekte wahrscheinlich irrelevant, wenn nur eine minimale Steigerung der Wirkung, wie beispielsweise bei der Kombination von Cisplatin und Luminespib in MUC – 1 Zellen, erfolgt und das Nebenwirkungsprofil durch zwei Wirkstoffgaben gesteigert werden würde. Die stärksten kombinierten Effekte waren mittels Ganetespib beziehungsweise Luminespib zusammen mit Etoposid oder Doxorubicin zu verzeichnen (*Ergebnisteil 5.5.2 Abbildung 21*). Synergistische und additive Effekte konnten auch hier vor allem in NCI – H295R Zellen beobachtet werden. Besonders deutlich war die Wirksamkeit bei der Behandlung mit niedriger Dosierung von Ganetespib und Doxorubicin (*Ergebnisteil 5.5.2 Abbildung 21*) sowie bei der Therapie mit Ganetespib und Etoposid zu beobachten (*Ergebnisteil 5.5.2 Abbildung 21*). Darüber hinaus waren bei niedriger Dosis von Luminespib und Etoposid in NCI – H295R Zellen wirkverstärkende Effekte zu erkennen. Zusätzlich reagierten auch die MUC – 1 Zellen auf Ganetespib oder Luminespib zusammen mit Etoposid im niedrigeren Dosisbereich (*Ergebnisteil 5.5.2 Abbildung 21*). Eine Kombination von niedrig dosiertem Ganetespib mit niedrig dosiertem Doxorubicin zeigte eine weitere Wirkungsverstärkung in MUC – 1 Zellen. Im Allgemeinen ist zu vermerken, dass vor allem eine niedrigere Dosierung der Zytostatika (Doxorubicin und Etoposid) als auch der HSP90 Inhibitoren (Ganetespib und Luminespib) einen Zusatzeffekt zeigten. Dieses kann für zukünftige Projekte eine Rolle spielen, indem eine Reduzierung der Wirkstoffe sowie der Wirkstoffdosis bei gleicher Wirkeffizienz meistens mit einem besseren Nebenwirkungsprofil einhergeht. So konnte bereits in anderen Tumoren eine Verbesserung der tumorspezifischen Therapie durch eine Kombination mit HSP90 Inhibitoren erzielt werden [118, 119, 156-158].

Die Kombination der verwendeten C – terminalen HSP90 Inhibitoren (Silibinin, Novobiocin) mit Doxorubicin zeigte in NCI – H295R Zellen keine deutliche Wirkungsverstärkung (*Ergebnisteil 5.5.2 Abbildung 24*). Die Zweifachbehandlung mittels Etoposid und C – terminalen HSP90 Inhibitor führte hingegen zu einer Steigerung der Effektivität. Jedoch ist hier zu beachten, dass sehr hohen Dosen Etoposid (100,0 μM) verwendet werden mussten, um diesen Effekt zu sehen. In MUC – 1 Zellen wurden synergistische Effekte bei der Behandlung von Silibinin bzw. Novobiocin zusammen mit Doxorubicin (2,0 μM) detektiert. Diese Wirkverstärkung war nur bei hohen Konzentrationen von Silibinin (40,0 μM) bzw. Novobiocin (100,0 μM) und bei 2,0 μM Doxorubicin zu sehen. Bei einer anderen Konzentrationskonstellation konnten keine synergistischen / additiven Effekte verzeichnet werden. Daher ist diese Wirkstoffkombination für zukünftige Experimente keine Behandlungsalternative. Etoposid zeigte zusammen mit Novobiocin oder Silibinin im niedrigeren Konzentrationsbereich additive Effekte in MUC – 1 Zellen. Jedoch konnten auch hier keine allgemein gültige Wirkverstärkung beobachtet werden (*Ergebnisteil 5.5.2 Abbildungen 25*).

Durch die wirksamen Kombinationsbehandlungen von HSP90 Inhibitoren (hier vor allem Luminespib und Ganetespib) mit Wirkstoffen des EDP – M Schemas (hier vor allem Etoposid und Doxorubicin) konnten in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine Wirkstoffreduktion auf zwei Wirkstoffe (HSP90 Inhibitor + 1 Wirkstoff des EDP – M Schemas) eine mögliche Behandlungsstrategie für das NNRK wäre. Hierfür können zukünftige Untersuchungen am Mausmodell hilfreiche Auskünfte über die *in vivo* Wirksamkeit und möglicherweise über die Verbesserung des Nebenwirkungsprofils der Einzel - sowie der Kombinationstherapie beim NNRK liefern. Der weitere Vorteil für zukünftige klinische Applikationen von Luminespib und Ganetespib ist deren bessere Bioverfügbarkeit und ein besseres Nebenwirkungsprofil im Vergleich zu Geldanamycin und seinen Derivaten der ersten Generation [101, 159].

Obwohl die Daten, die in dieser Arbeit dargestellt sind, noch zu wenig umfassend sind, um eine konkrete Aussage treffen zu können, ist es interessant, dass die Zelllinie, die weniger HSP90 exprimiert (NCI – H295) im Allgemeinen mit einem stärkeren Ansprechen vor allem auf die N – terminale HSP90 Inhibitor Therapie reagiert. Diese Beobachtung zeigt, dass sogar eine effektive Behandlung mit HSP90 Inhibitoren stattfinden kann, auch wenn HSP90 wenig exprimiert vorliegt. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine HSP90 Inhibitor Therapie vielversprechende anti – tumorale Effekte bei der Behandlung von zwei NNRK Zelllinien sowie einer Primärkultur zeigte und dass die Wirkeffizienz in NCI – H295R Zellen auf die Einzelgabe der HSP90 Inhibitoren als auch auf die Kombination mit Wirkstoffen des EDP – M Schemas besser war als bei MUC – 1 Zellen. Um den Stellenwert der HSP90 Inhibitoren nochmals hervorzuheben, ist auf die laufenden klinischen Studien in verschiedensten Tumorarten, beispielsweise bei Lungen – sowie Brusttumoren, hinzuweisen. Eine exakte Übersicht der durchgeführten beziehungsweise noch laufenden Studien ist in der Datenbank (ClinicalTrials.gov) zu finden⁴.

⁴ https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=ganetespib&age_v=&gndr=&type=&rslt=With&Search=Apply
https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=AUY-922&age_v=&gndr=&type=&rslt=With&phase=1&phase=2&Search=Apply;

6.3 Beeinflussung von Tumorsignalkaskaden durch HSP90 Inhibitoren

Durch die vielseitige Betrachtung der anti – tumoralen Effekte der verwendeten HSP90 Inhibitoren konnte bereits gezeigt werden, dass vor allem Ganetespib und Luminespib in Einzel – und Zweifachtherapie mit Wirkstoffen des EDP – M Schemas vielversprechende Wirkungen zeigten. Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit bestand darin, herauszufinden, welche Signalkaskaden im NNRK durch eine HSP90 Inhibition beeinflusst werden können, um somit die Auswirkung der HSP90 Inhibition im zellulären Kontext erklären zu können.

Aus der Literatur sind bereits mehrere Signalwege bekannt, die bei Fehlregulierung zur krankhaften Entwicklung der Nebennierenrinde beitragen können. Beispielsweise ist der Wnt / β – catenin Signalweg essentiell für die Ausbildung der Nebennierenrinde [160] und bei einer fehlerhaften Aktivierung trägt dieser zur Entstehung von Nebennierenrindentumoren bei [22, 23]. Weitere wichtige Signalwege für die Tumorentwicklung sind der MAPK Signalweg sowie der mTOR Signalweg, welche auch bei der Ausbildung des NNRK eine Rolle spielen [27, 28, 161]. In der Literatur ist bereits für andere Tumorarten wie beispielsweise das Gallengangskarzinom [162], dem multiplen Myelom [163] und gastrointestinale neuroendokrine Tumore [164] beschrieben worden, dass das HSP90 Molekül Interaktionspotential mit dem PI3K / AKT / mTOR aufweist. HSP90 zeigt auch Wechselwirkungen an verschiedenen Stellen des MAP Kinase Signalweges (ERK1/2) [165, 166], da wichtige Proteine der Signalkaskaden Client Proteine des HSP90 sind. [167-170]. So konnte beispielsweise eine Beeinflussung des ERK – Signalweges durch HSP90 Inhibition in multiplen Myelom – Zellen und in verschiedenen humanen Leukämie Zelltypen beobachtet werden [171, 172].

In der vorliegenden Arbeit konnte durch Untersuchungen des Serin / Threonin Kinase AKT Signalweges gezeigt werden, dass Luminespib sowie Ganetespib einen Einfluss auf die Expression der phosphorylierten und dephosphorylierten Form von AKT haben. Dadurch kam es auch zu einer Reduktion der aktivierten phosphorylierten mTOR Form unter Luminespib und Ganetespib Therapie. Die verwendeten C – terminalen HSP90 Inhibitoren (Silibinin und Novobiocin) führten nach 48 stündiger Behandlungsdauer der NCI – H295R und MUC – 1 Zelllinie zu keiner Beeinflussung des AKT Signalkaskadeweges (*Ergebnisteil 5.6 Abbildung 26 A*). Somit konnte gezeigt werden, dass beide Zelllinien auf ähnliche Weise auf die HSP90 Inhibitor Therapie bezüglich des AKT Signalweges reagierten.

Für die weiteren Untersuchungen war es entscheidend, dass die unterschiedliche Ansprechrate auf die HSP90 Inhibitor Therapie zwischen den beiden verwendeten Zelllinien entschlüsselt werden sollten. NCI – H295R als auch die MUC – 1 Zelllinie reagierten zwar auf eine Therapie mittels Luminespib und Ganetespib, jedoch mit unterschiedlichem Ausmaß. Bei der Betrachtung des ERK1/2 Signalweges (MAP Kinase Signalweg) war eine Reduktion der phosphorylierten ERK1/2 Variante unter Luminespib und Ganetespib lediglich in MUC – 1 Zellen zu beobachten. In NCI – H295R kam es zwar auch wie in MUC – 1 Zellen zu einer Abnahme von cRAF, p – cRAF und p – MEK1/2 unter Luminespib und Ganetespib Therapie. Jedoch zeigten NCI – H295R Zellen keine Reduktion in der Expression von p – ERK1/2 (*Ergebnisteil 5.6 Abbildung 26 A*). Interessanterweise zeigte die Zelllinie, die schlechter auf die HSP90 Inhibitor Therapie ansprach eine stärkere Beeinflussung des ERK Signalweges als die NCI – H295R Zellen. Um diese Beobachtung in MUC – 1 zu untermauern, wurden MUC-1 Zellen mit Luminespib und Ganetespib inkubiert und die ERK1/2 beziehungsweise die p – ERK1/2 Expression durch Immunfluoreszenzfärbung wurde ermittelt (*Ergebnisteil 5.6 Abbildung 26 B und 26 C*). Die Beobachtungen des Western Blots, bei der unter Luminespib und Ganetespib Therapie es zu einer Abnahme der p – ERK Expression in MUC – 1 Zellen kommt, konnten durch die IF – Färbung nochmals bestätigt werden. Somit kann geschlussfolgert werden, dass sowohl der ERK1/2 als auch der AKT Signalweg dazu beitragen könnten, um die Wirkung der HSP90 Inhibitoren in den verwendeten NNRK Zelllinien zu erklären. Warum die MUC – 1 Zellen, trotz einer Beeinflussung des ERK1/2 Signalweges, schwächer auf die Luminespib und Ganetespib Therapie reagieren, kann möglicherweise daran liegen, dass der Patient, aus den die MUC – 1 Zellen etabliert worden waren, bereits mit EDP – M behandelt worden war. Dadurch konnte der Tumor eventuelle Resistenzmechanismen ausbilden, die trotz Beeinflussung verschiedenster Signalkaskaden zu keinem besseren Therapieerfolg mit HSP90 Inhibitoren führten, da eine Kompensation durch andere Signalwege erfolgte.

6.4 Modulation der Kortisolsekretion durch HSP90 Inhibition

Wie aus Publikationen bereits bekannt und in der Einleitung unter 1.2.2 erwähnt, ist der GR ein Client Protein des HSP90 Moleküls [173-176], woraus auf einen Zusammenhang zwischen HSP90 Expression und GR – Funktionalität geschlossen werden kann. Es konnte bei Riebold et al. 2015 beobachtet werden, dass kortikotrophe Adenomen eine abnormale Expression oder Aktivität von HSP90 α und HSP90 β im Vergleich zu normalem Hypophysengewebe aufwarfen [83]. Die dort verwendeten C – terminalen HSP90 Inhibitoren führten zu einer Normalisierung der Glukokortikoid – Resistenz und hatten somit einen direkten Einfluss auf die kortikotrophen Adenomen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression des GR beziehungsweise die Kortisolsekretion in NNRK Zellen betrachtet. Die GR Expression wurde deutlich durch die 48 stündige Behandlung mittels Luminespib oder Ganetespib (je 0,2 μ M) in NCI – H295R als auch in MUC – 1 Zellen reduziert (*Ergebnisteil 5.2 Abbildung 12*). Novobiocin und Silibinin führten hingegen zu keiner Abnahme der GR – Expression. In Hypophysentumorzellen waren diese Beobachtungen von einer Reduktion der GR Expression nach der Therapie mit N – terminalen HSP90 Inhibitoren (17 – AAG) bekannt [83]. Zusätzlich konnte bei Riebold et al keine Reduktion vom GR durch die Behandlung mittels Novobiocin oder Silibinin beobachtet werden. Dieses Erkenntnis wurde durch die hier durchgeführten Untersuchungen auch in NNRK Zelllinien bestätigt. Aufgrund dieser Beobachtungen war es in einem nächsten Schritt wichtig herauszufinden, wie sich die HSP90 Inhibitor Therapie auf die Kortisolsekretion auswirken würde. Hierbei stand die Frage im Fokus, ob der Hyperkortisolismus, welcher bei 50% [30] der NNRK Patienten auftritt, durch die HSP90 Inhibitoren verbessert werden könnte. Es konnte festgestellt werden, dass neben Ganetespib vor allem die verwendeten C – terminalen HSP90 Inhibitoren, Novobiocin und Silibinin, eine signifikante Reduktion der Kortisolsekretion im gewählten Dosisbereich zeigten, ohne eine starke Beeinträchtigung auf die Zellviabilität von NCI – H295R Zellen zu bewirken (*Ergebnisteil 5.7 Abbildung 27*). Diese Ergebnisse lassen die Vermutungen zu, dass die GR Expression nicht in einem direkten Zusammenhang mit der Sekretion des Kortisols, welches der Ligand des GR ist, steht, da ansonsten Luminespib eine ähnliche Wirkung hätte zeigen müssen wie Ganetespib. Des Weiteren kann angenommen werden, dass eine Überexpression von HSP90 β in Nebennierenrindenkarzinomen [140] dazu führen kann, dass vermehrt HSP90 an GR gebunden bleibt und somit ihn nicht funktionsfähig für die Bindung von Glukokortikoiden macht. Da eine Therapie mit C – terminalen HSP90 Inhibitoren wieder zu einer Trennung des HSP90 – GR – Komplexes führen kann, ist eine gesteigerte Aktivität

des GR zu erwarten. Dieser Mechanismus könnte durch einen autokrinen Feedback – Mechanismus modulierend auf die Bindung von Glukokortikoiden an den GR wirken und daher mit einer Abnahme an freiem Kortisol einhergehen. Dieses wäre eine mögliche Erklärung für die Reduktion an Kortisol in den Zellkulturüberständen von NCI – H295R Zellen durch Silibinin oder Novobiocin Therapie (*Ergebnisteil 5.7 Abbildung 27*). Aus der Literatur ist bekannt, dass in der AtT – 20 Zelllinie, welche eine Hypophysentumorzelllinie der Maus darstellt, durch Novobiocin oder Silibinin Behandlung die Glukokortikoid – Resistenz verringert wird und somit der GR wieder sensitiver gegenüber Glukokortikoiden ist [83]. Der GR benötigt zwar für die Bindung von Glukokortikoiden HSP90, jedoch ist es für die Genexpression wichtig, dass HSP90 nicht mehr am GR gebunden vorliegt [173, 177]. Die Auswirkungen der verwendeten N – terminalen HSP90 Inhibitoren bei der Betrachtung des GR und der Kortisolsekretion sind uneinheitlich. Luminespib und Ganetespib führten zwar zur Reduktion des GR in beiden Zelllinien. Aber nur Ganetespib zeigte ähnliche Effekte auf die Beeinflussung der Kortisolsekretion wie die C – terminalen HSP90 Inhibitoren in NCI – H295R Zellen. Das lässt vermuten, dass die Beeinflussung der Kortisolsekretion durch N – terminale HSP90 Inhibitoren auf unterschiedliche Weise innerhalb der Wirkstoffgruppe abläuft und kann zu dem Schluss führen, dass Ganetespib der bessere N – terminale HSP90 Inhibitor zur Therapie des NNRK ist.

Kortisol konnte lediglich in NCI – H295R Zellen quantifiziert werden, da die Kortisolsekretion von MUC – 1 Zellen mit der gewählten Methode nicht messbar war. Für eine Bestimmung des Kortisolgehaltes in MUC – 1 Zellen könnte für zukünftige Experimente die LC – MS (Liquidchromatographie – Massenspektroskopie) eine geeignete Methode sein, um auch bei sehr niedrigen Kortisolkonzentrationen eine aussagekräftige Messung durchführen zu können. Der in dieser Arbeit durchgeführte Immunoassay hat bezüglich der Einfachheit der Durchführung (Automatisierung), den relativ hohen Probendurchsatz und des geringen Ressourcenverbrauchs Vorteile gegenüber der Massenspektroskopie (MS), wodurch es hier als labormedizinische Methode Anwendung gefunden hat. Der Nachteil gegenüber der Massenspektroskopie liegt in der mangelnden Spezifität [178, 179]. Aufgrund der hohen Spezifität und Sensitivität der Massenspektroskopie kann man durch diese Methode im nanomolaren Bereich ein komplettes Steroidprofil aus verschiedenen Ressourcen bestimmen [180-182]. Daher wäre die MS eine geeignete Methode für die Steroidbestimmung in MUC – 1 Zellen.

6.5 Ausblick

Die Behandlungsoptionen eines seltenen jedoch sehr komplexen Tumortyps, wie die des NNRK, sind aufgrund von wenigen präklinischen Modellen schwierig zu optimieren. Neben dem Verhindern eines Rezidivs liegt die höchste Priorität in der Verbesserung der Lebensqualität der erkrankten Patienten. Dieses ist zum einen durch einen stetigen Erkenntnisgewinn über die genetischen Veränderungen des Tumors zu gewährleisten und zum anderen durch das Testen von Wirkstoffen, welche aus anderen Tumorentitäten auf das NNRK transferiert werden können.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten NNRK Zelllinien, NCI – H295R und MUC – 1, spiegeln lediglich einen Teil der genetischen Heterogenität eines NNRK wider. Daher ist es empfehlenswert, die präklinischen Untersuchungen von HSP90 Inhibitoren auf die 2018 neu beschriebenen NNRK Zelllinien auszudehnen [53]. Somit kann die Wirkweise der HSP90 Inhibitoren im NNRK weiter bestätigt werden und eine solidere Bestimmung der Wirkstoffe, welche für *in vivo* Versuche verwendet werden könnten, kann getroffen werden.

Eine genaue Übertragbarkeit der Wirkstoffdosierungen von *in vitro* zu *in vivo* Modellen ist nur schwer möglich, da im Organismus vor allem die pharmakokinetischen Aspekte (Freisetzung, Aufnahme, Verteilung, Metabolismus, Ausscheidung der eingesetzten Pharmaka) eine wichtige Rolle spielen. Daher muss zu Beginn eine aus der Literatur bekannte bzw. eine empirische Dosisbestimmung erfolgen, um damit das Wirkungs – und Toxizitätsprofil abklären zu können. Des Weiteren können die in dieser Arbeit getesteten Kombinationsbehandlungen mit den Wirkstoffen des EDP – M Schemas in Mausmodellen durchgeführt werden. Hier sollte das aktuell in der Klinik verwendete EDP – M Schema als Kontrollgruppe, neben der unbehandelten Gruppe, untersucht werden.

Damit die Wirkung der HSP90 Inhibitoren vor allem im Tumor zum Tragen kommt und das nicht – tumoröse Gewebe weitestgehend verschont bleibt, sollte auch über eine Applikation mittels Nanopartikel beziehungsweise eine Markierung mittels spezifischen Antikörpern gegen NNRK Antigene nachgedacht werden. Dafür ist es essentiell spezifische Oberflächentumorantigene zu bestimmen, welche dann als Zielstruktur für die Antikörper dienen.

Eine Verkapselung von Wirkstoffen und die daraus resultierende gezieltere präklinische Applikation sind für andere Tumorarten wie beispielsweise Brustkrebszellen, nicht – kleinzellige

Lungentumore und Darmkrebs bereits in der Literatur beschrieben wurden [183-186]. Aufgrund der kleinen chemischen Struktur der HSP90 Inhibitoren wäre eine Verkapselung gut möglich und somit auch eine gezieltere Applikation [187-189]. Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass eine Verkapselung von EDP – M in Liposomen bei der Therapie des NNRK zu einer Verbesserung des Nebenwirkungsprofils führte [190].

Darüber hinaus ist es entscheidend, dass die Behandlung des NNRK möglichst patientenindividuell erfolgt. Dafür sollten weitere Tumormarker gefunden und definiert werden, die eine prognostische Aussagekraft haben. Danach kann, anhand des Vorhandenseins bzw. der Abwesenheit von bestimmten Tumormarkern, eine individuelle Therapie erfolgen. Richtungsweisend ist beispielsweise die erfolgreichere Behandlung des HER2 positiven Brustkrebs und der Leukämie mittels „antibody – drug – conjugates“ [191-196] (*Abbildung 28*). Diese Therapie sollte möglichst ergänzend bei inoperablen / partiell operablen Tumoren erfolgen und somit ein Rezidiv bzw. eine Progression verhindern. Bei Cowley et al. wurde berichtet, dass das Prostata – spezifische – Membran – Antigen erhöht ist in NNR Tumoren und hier vor allem bei Nebennierenrindenkarzinomen, die eine gesteigerte Neovaskularisierung und somit eine erhöhte Metastasenbildung aufweisen [197]. Dieses Antigen könnte ein potentielles Target für spezifische Antikörper, welche an zytotoxischen Wirkstoffen (beispielsweise HSP90 Inhibitoren) gebunden sind, sein und könnte somit eine neue Behandlungsoption für das NNRK darstellen. Da die durchgeführte JAVELIN Phase 1 Studie nur moderate Erfolge bei der Behandlung des NNRK mittels Avelumab zeigte, sind weitere Untersuchungen der gezielten Applikation mittels Antikörper – Wirkstoff – Konjugat beim NNRK notwendig [198, 199].

Die *in vitro* Untersuchungen, welche in dieser Arbeit durchgeführt worden waren, zeigten bereits, dass die zwei verwendeten NNRK Zelllinien unterschiedlich auf die Therapie mit HSP90 Inhibitoren ansprachen. Eine unterschiedliche Reaktion auf die Behandlung mit EDP – M wurde bereits innerhalb der NCI – H295R Zelllinie beschrieben [44], welches wiederum erneut auf die Komplexität und Individualität des NNRK hinweist. Daher ist die Etablierung weiterer Zelllinien sowie präklinischer Untersuchungsmodelle unabdingbar. Des Weiteren ist aus der Literatur bekannt, dass nicht alle NNRK Patienten mit dem gleichen Behandlungserfolg auf die EDP – M Therapie reagieren [38]. Einige von ihnen sprechen nicht auf die Behandlung mittels EDP – M an, wodurch nochmals die Notwendigkeit einer patientenindividuellerer Therapie befürwortet wird, da das Nebenwirkungsprofil der EDP – M Behandlung trotz Wirkungslosigkeit erhalten bleibt.

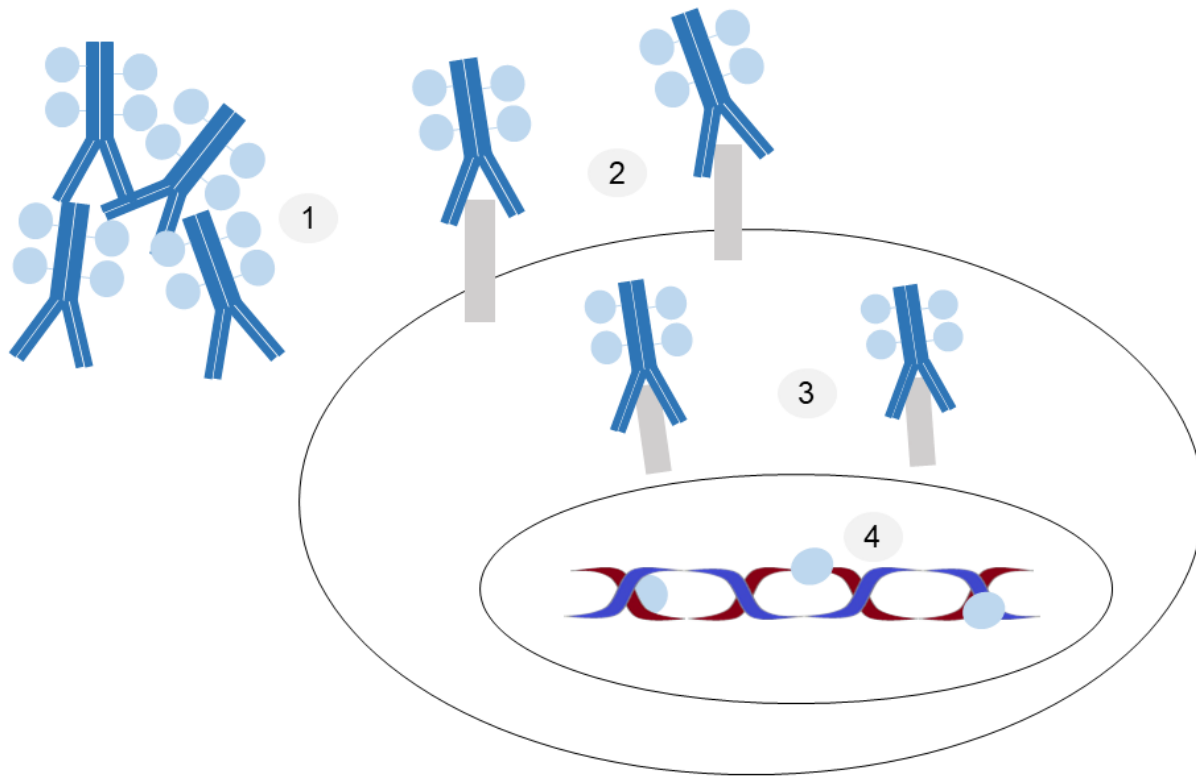


Abbildung 28: Gezielte Therapie mittels Antikörper – Wirkstoff – Immunkonjugat

Dargestellt ist die Applikation eines Antikörpers gegen ein spezifisches Oberflächenprotein der NNRK Zellen. Der Antikörper ist mittels eines Linkers an einen Wirkstoff gekoppelt (1) und befindet sich in der Blutbahn. Nachdem der Antikörper an das Oberflächenprotein gebunden hat (2), wird der Komplex in die Zelle transportiert (3). Nach Freigabe des Wirkstoffes kann dieser seine entsprechende Funktion in der NNRK Zelle gezielt ausüben (4). In dieser Abbildung wird beispielhaft die Bindung des Wirkstoffes an der DNA und somit eine Beeinflussung der Gentranskription dargestellt. Im Falle der Verwendung von HSP90 Inhibitoren, welche an Antikörpern gebunden sind, werden diese auch ihre Wirkung im Zytoplasma ausüben [200] (Abbildung modifiziert und vereinfacht nach Peters et al., 2015).

Ein weiterer Aspekt für zukünftige Experimente wäre das Untersuchen der Zelllinien *in vitro*, mit dem Ziel, die Mechanismen des unterschiedlichen Therapieansprechens aufzuklären. Beispielsweise wäre der Zelltode der MUC – 1 Zellen ein interessanter Gesichtspunkt, da anhand der hier durchgeführten Experimente ein programmierter Zelltod (Apoptose) ausgeschlossen werden konnte. Hierfür sollten weitere Untersuchungen über andere Zelltodursachen wie beispielsweise Nekrose und Zell – Seneszenz betrachtet werden. Somit kann ein Einblick gewonnen werden, warum die MUC – 1 Zellen schwächer als die NCI – H295R Zellen auf die HSP90 Inhibitor Therapie ansprechen.

Es steht außer Frage, dass durch die aufgezeigten Resultate HSP90 als potentielles Target für die Behandlung eines NNRK eine Rolle spielt. Jedoch sind trotz alledem weitere *in vitro* Untersuchungen und Experimente am Tiermodell notwendig, um einen Transfer der HSP90 Inhibitoren in klinische Studien des NNRK zu gewährleisten.

7. Zusammenfassung

Das Nebennierenkarzinom ist ein seltener, jedoch hochmaligner Tumor, mit einer Erkrankungshäufigkeit in der ersten und erneut zwischen der vierten und fünften Lebensdekade. Aufgrund der Seltenheit dieser Erkrankung und der funktionellen Heterogenität der Tumore stehen zum einen sehr wenige präklinische Modelle für die Untersuchung des Nebennierenrindenkarzinoms zu Verfügung und zum anderen spiegeln die bereits vorhandenen Modelle nicht die Komplexität der Erkrankung wider. Darüber hinaus ist die aktuelle therapeutische Behandlung des NNRK unzureichend bezüglich Therapieerfolg sowie Verbesserung der Lebensqualität betroffener Patienten. Daher war das Hauptziel der vorliegenden Promotionsarbeit, HSP90 als potentiell neues therapeutisches Target und HSP90 Inhibitoren als weitere Behandlungsoption für das NNRK zu untersuchen. Basierend auf den hier durchgeführten Experimenten wurden die Expression von HSP90 α/β und HSP90 β in NNRK Xenograftgewebe nachgewiesen, wobei unterschiedliche Expressionsstärken zwischen NCI – H295R und MUC – 1 Xenograftgewebe zu verzeichnen waren. Zusätzlich konnte auch in NNRK Zellen die vor allem zytoplasmatische Lokalisierung von HSP90 α/β und HSP90 β gezeigt werden. Dadurch ergaben sich indirekt Hinweise, dass HSP90 als Targetstruktur auch im NNRK eine Rolle spielen könnte. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurde anhand von Literaturrecherche zuerst eine Auswahl an N – und C – terminalen HSP90 Inhibitoren getroffen. Die gewählten HSP90 Inhibitoren (Silibinin und Novobiocin als Vertreter der C – terminalen HSP90 Inhibitoren sowie 17-AAG, Luminespib und Ganetespib als der Vertreter der N – terminalen HSP90 Inhibitoren) wurden mittels *in vitro* Versuchen an zwei NNRK Zelllinien, NCI – H295R und MUC – 1, auf ihre Wirksamkeit getestet. Dabei stellte sich heraus, dass vor allem die N – terminalen HSP90 Inhibitoren der späteren Generation, Luminespib und Ganetespib, signifikante anti – tumorale Effekte in Einzel – oder Kombinationstherapie mit Wirkstoffen des EDP – M Schemas bei beiden Zelllinien zeigten. Jedoch mit einer im Allgemeinen deutlich geringeren Ansprechrate in MUC – 1 Zellen. Darüber hinaus wurden spezifische onkogene Signalkaskadenwege des NNRK in beiden verwendeten Zelllinien analysiert. Hierbei stand vor allem die Beeinflussung des MAPK und des AKT Signalweges unter Luminespib und Ganetespib Therapie im Vordergrund. Interessanterweise zeigten MUC – 1 Zellen eine Reduktion von ERK1/2 und weiterer „downstream“ Bestandteile im MAPK Weg. In der NCI – H295R Zelllinie, welche zwar stärker auf die Behandlung von Luminespib und Ganetespib reagierte, war hingegen keine Reduktion an ERK1/2 zu beobachten. Des Weiteren konnten auch die verwendeten C – terminalen HSP90 Inhibitoren (Novobiocin und

Silibinin) keinen Einfluss auf die betrachteten onkogenen Signalwege bewirken. Zusätzlich konnte durch die vorliegende Arbeit gezeigt werden, dass sowohl N – terminale als auch C – terminale HSP90 Inhibitoren die Kortisolsekretion von NCI – H295R Zellen und somit einen bestehende Cushing Syndrom Symptomatik positiv beeinflussen können.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass vor allem Ganetespib unter den verwendeten N – terminalen HSP90 Inhibitoren die umfassendsten anti – tumoralen Effekte in beiden verwendeten Zelllinien bewirkte. Obwohl in verschiedenen Bereichen Therapieunterschiede zwischen den zwei verwendeten Zelllinien beobachtet wurden, konnte durch diese Promotionsarbeit HSP90 als Target – Struktur etabliert werden und besonders die N – terminalen HSP90 Inhibitoren könnten eine potentiell neue Therapie (in Einzel – oder Kombinationsbehandlung mit den Wirkstoffen des EDP – M Schemas) für die Behandlung des NNRK sein.

8. Abkürzungen

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ADP	Adenosindiphosphat
AKT	auch aktivierte Proteinkinase B genannt
ANOVA	Analysis of Variance
ATP	Adenosintriphosphat
β – AKT	beta Aktin
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw	beziehungsweise
ca	circa
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
cRAF	c – rapidly accelerated fibrosarcoma; Gruppe von Proteinkinasen
CTD	C – terminale Domäne
DAPI	4', 6 – Diamidin – 2 – phenylindol
dd H ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	Zellkulturmedium („Dulbecco's Modified Eagle's Medium")

DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL Substrat	Enhanced Chemiluminescence Substrate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDP – M	bisheriger Goldstandard für die Therapie des NNRK [Etoposid, Doxorubicin, Cisplatin, Mitotane]
ELISA	Enzyme – linked Immunosorbent Assay
ENSAT	The European Network for the Study of Adrenal Tumors
ERK1/2	extracellular signal – regulated protein kinases
etc	et cetera
EtOH	Ethanol
FBS / FCS	Fetales Bovineserum / Fetales Kalbserum
g	Erdschwerebeschleunigung (Zentrifuge), Gramm
GR	Glukokortikoidrezeptor
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
HGF	Hepatocyte Growth Factor

HIP	HSP70 interacting protein
HOP	HSP90 – HSP70 organizing protein
HSE	Heat Shock Elements
HSF	Heat Shock Factors
HSP	Heat Shock Protein
HSP90	Heat Shock Protein 90
IF	Immunfluoreszenz
IHC	Immunhistochemie
IGF - 2	Insulin – like Growth Factor – 2
ITS	Insulin – Transferrin – Selenium
Ki67	Proliferationsmarker
konz.	Konzentriert
L	Liter
LC - MS	Liquidchromatographie Massenspektroskopie
LEDP - M	Etoposid, liposomales Doxorubicin und Cisplatin, Mitotane
MAPK	Mitogen aktivierende Protein – Kinase
MD	mittlere Domäne
MDR	Multi Drug Resistance

MEK1/2	Kinase der MAP – Kinase
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
min	Minute
Mio	Millionen
ml	Milliliter
MS	Massenspektroskopie
mTOR	mechanistic target of rapamycin
MTT	3 - (4,5 - Dimethylthiazol - 2 - yl) - 2,5 – diphenyltetrazoliumbromid
NaOH	Natronlauge
nm	Nanometer
NN	Nebenniere
NNM	Nebennierenmark
NNR	Nebennierenrinde
NNRK	Nebennierenrindenkarzinom
NTD	N – terminale Domäne
NVP – AUY922	Luminespib
P	Wahrscheinlichkeit („probability“)

PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
p – AKT	phosphorylierte Form des AKT
p – cRAF	phosphorylierte Form des cRAF
p – ERK1/2	phosphorylierte Form des ERK1/2
PFA	Paraformaldehyd
p – MEK1/2	phosphorylierte Form des MEK1/2
pmol	piko – mol
p – mTOR	phosphorylierte Form des mTOR
p – RSK	phosphorylierte Form des RSK
PI3K	Phosphoinositid 3 Kinase
rpm	rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
RAS	Protoonkogen
RIPA – buffer	Radioimmunprecipitation buffer
RPMI – 1640	Zellkulturmedium („Roswell Park Memorial Institute“)
RSK	ribosomal s6 Kinase, p90 ^{rsk} MAPK-activated protein kinase 1
s	Sekunde
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumlaurylsulfat)

SDS – PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamid Gel Electrophoresis
SF – 1	Steroidogenic factor 1
STA – 9090	Ganetespib
Tbl	Tabelle
TBS	Tris gepufferte Salzlösung
TBS – T	Tris gepufferte Salzlösung mit Tween®20
TE	Tris – EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tween®20	Polysorbat 20
UV	Ultraviolett
V	Volt
W	Watt
ZIP	Zero Interaction Potency
17 – AAG	17 – Allylamino – 17 – Dimethoxy – Geldanamycin
17 – DMAG	17 – Dimethylamino – Geldanamycin
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Nebenniere.....	4
Abbildung 2: Das Nebennierenrindenkarzinom	6
Abbildung 3: Schematische Darstellung des HSP90 Moleküls	9
Abbildung 4: HSP90 Chaperon – Zyklus.....	11
Abbildung 5: HSP90 Inhibitoren	17
Abbildung 6: Ziele der Arbeit.....	18
Abbildung 7: Reaktionsgleichung MTT.....	42
Abbildung 8: Immunhistochemie HSP90α/β.....	54
Abbildung 9: Immunhistochemie HSP90β.....	55
Abbildung 10: Immunfluoreszenz	56
Abbildung 11: Western Blot Analyse von HSP90α und HSP90β.....	57
Abbildung 12: Western Blot Analyse des Glukokortikoidrezeptors	57
Abbildung 13: Effekte von HSP90 Inhibitoren auf die Zellviabilität	59
Abbildung 14: Effekte von HSP90 Inhibitoren auf die Proliferation	61
Abbildung 15: Effekte von HSP90 Inhibitoren auf die Apoptose	63
Abbildung 16: Effekte von HSP90 Inhibitoren auf die Zellmigration.....	65
Abbildung 17: Zellviabilität Primärkultur	66

Abbildung 18: Effekte von Etoposid, Doxorubicin und Cisplatin auf die Zellviabilität.....	67
Abbildung 19: Effekte von Mitotane auf die Zellviabilität	68
Abbildung 20: Kombinationsbehandlungsstrategien	69
Abbildung 21: Auswirkung der Kombinationsbehandlungen auf die Zellviabilität [1]	70
Abbildung 22: Auswirkung der Kombinationsbehandlung auf die Zellviabilität [2]	71
Abbildung 23: Auswirkung der Kombinationsbehandlung auf die Zellviabilität [3]	72
Abbildung 24: Auswirkung der Kombinationsbehandlung auf die Zellviabilität [4]	73
Abbildung 25: Auswirkung der Kombinationsbehandlung auf die Zellviabilität [5]	73
Abbildung 26: Einfluss der HSP90 Inhibitoren auf den ERK1/2 und AKT Signalweg.....	75
Abbildung 27: Auswirkung der HSP90 Inhibition auf die Kortisolsekretion	76
Abbildung 28: Gezielte Therapie mittels Antikörper – Wirkstoff – Immunkonjugat.....	90

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über HSP90 Inhibitoren	16
Tabelle 2: Verwendetes Equipment.....	22
Tabelle 3: Eingesetzte Chemikalien	24
Tabelle 4: Verwendete Kits und Assays	25
Tabelle 5: Verwendete Medien und Reagenzien für Zellkulturexperimente	26
Tabelle 6: Verwendete Medien und Reagenzien für Laborexperimente	26
Tabelle 7: Verwendete Lösungen und Puffer	33
Tabelle 8: Verwendete primäre Antikörper für IHC und IF.....	34
Tabelle 9: Verwendete primäre Antikörper für Western Blot.....	35
Tabelle 10: Verwendete sekundäre Antikörper	36
Tabelle 11: Eingesetzte Softwares, Datenbanken und Internetanwendungen	36
Tabelle 12: Konditionen der HSP90 Inhibition [Einzelbehandlungen]	44
Tabelle 13: Konditionen der EDP – M Behandlung [Einzelbehandlung].....	44
Tabelle 14: Konditionen der Kombinationsbehandlung [HSP90 Inhibitor – EDP – M].....	47

11. Publikationen und Präsentationen

Original Publikationen

Heat shock protein 90 as a prognostic marker and therapeutic target for adrenocortical carcinoma

Siebert C, Ciato D, Murakami M, Frei-Stuber L, Perez-Rivas LG, Monteserin-Garcia JL, Nölting S, Maurer J, Feuchtinger A, Walch AK, Haak HR, Bertherat J, Mannelli M, Fassnacht M, Korpershoek E, Reincke M, Stalla GK, Hantel C, Beuschlein F.

Front Endocrinol (Lausanne). 2019 Jul 19;10:487. doi: 10.3389/fendo.2019.00487. eCollection 2019.; PMID: 31379752

Poster Präsentationen

The molecular chaperone Heat shock protein 90 (Hsp90) as novel therapeutic target for the treatment of adrenocortical carcinoma (ACC)

Siebert C, Ciato D, Li R., Monteserin-Garcia J. L., Stalla GK, Hantel C, Beuschlein F.

ENS@T Scientific Meeting 16/17.11.2017 Paris, Frankreich

Effects on cellular processes and potent anti-tumoral properties of several Hsp90 inhibitors in adrenocortical carcinoma

Siebert C, Ciato D, Monteserin-Garcia J. L., Shapiro I., Stalla GK, Hantel C, Beuschlein F.

Adrenal cortex conference 25-27.06.2018, München, Deutschland

Heat shock proteins (Hsp) as novel therapeutic target in ACC

Siebert C, Ciato D, Monteserin-Garcia J. L., Shapiro I., Stalla GK, Hantel C, Beuschlein F.

1st Retreat (CRC, Transregio 205) 27.-29.06.2018, Tutzing, Deutschland

The molecular chaperone Heat shock protein 90 (Hsp90) as novel therapeutic target for the treatment of adrenocortical carcinoma (ACC) and Cushing syndrome

Siebert C, Ciato D, Monteserin-Garcia J. L., Shapiro I., Stalla GK, Hantel C, Beuschlein F.

Young scientists meeting (CRC, Transregio 205) 17.-19.10.2018, Dresden, Deutschland

The molecular chaperone Heat shock protein 90 (Hsp90) as novel therapeutic target for the treatment of adrenocortical carcinoma (ACC) and Cushing syndrome

Siebert C, Ciato D, Monteserin-Garcia J. L., Shapiro I., Stalla GK, Hantel C, Beuschlein F.

ENS@T Scientific Meeting 22/23.11.2018 Florenz, Italien

Heat shock protein 90 (HSP90) as therapeutic target for adrenocortical carcinoma (ACC)

Siebert C, Ciato D, Nölting S., Maurer J., Monteserin-Garcia J. L., Stalla GK, Hantel C, Beuschlein F.

2nd Retreat (CRC, Transregio 205) 07.-10.05.2019, Bad Staffelstein, Deutschland

Vorträge

Preclinical progress and first translational steps for a liposomal chemotherapy protocol against adrenocortical carcinoma

Jung S, Nagy Z, Fassnacht M, Zambetti G, Weiss M, Reincke M, Igaz P, Beuschlein F, Hantel C.

Endocr Relat Cancer. 2016 Oct;23(10):825-37. doi: 10.1530/ERC-16-0249. Epub 2016 Aug 22.; PMID: 27550961

JADE-Meeting (Berlin, Deutschland) 10/2016 und Symposium Gentianum (Fraueninsel Chiemsee, Deutschland) 02/2017,

12. Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Felix Beuschlein für das spannende Projekt, für die kollegiale Zusammenarbeit und für ihre Geduld sowie Diskussionsbereitschaft bedanken. Vor allem ihre Unterstützung durch zahlreiche fachliche Gespräche und der hilfreiche Support bei der Durchführung der Experimente haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Des Weiteren möchte ich die Gelegenheit nutzen, um mich bei ihnen für die Möglichkeit der Teilnahme an nationalen und internationalen Konferenzen zu bedanken. Dadurch konnte ich meine Ergebnisse vorstellen und aufgrund konstruktiver Kritik neue Ideen für mein Projekt sammeln. Prof. Dr. Martin Reincke danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung der Experimente in seinen Laboren. Frau Dr. Constanze Hantel möchte ich für die sehr gute Einarbeitung, die anfängliche Betreuung des Projektes und für die Bereitstellung der MUC – 1 Zelllinie danken.

Einen ganz besonderen und großen Dank möchte ich jeden Einzelnen vom Labor der Med. IV aussprechen. An dieser Stelle ist es für mich schwer einzelne Personen besonders hervorzuheben. Jeder hat auf seine Weise dazu beigetragen, dass die vorliegende Arbeit zustande gekommen ist. Aufgrund der häufigen personellen Veränderungen habe ich während der Anfertigung meiner Dissertation viele verschiedene Menschen mit zum Teil sehr interessanten Fähigkeiten kennenlernen dürfen. Trotz allem gilt mein besonderer Dank Charlotte Reich, Dr. Paula Colon-Bolea und Diana Jaquin. Dank eurer fachlichen Hilfe und vor allem dank eurer menschlichen Unterstützung wurden der Laboralltag zu einer sehr schönen Zeit und wir zu guten Freunden. Zusätzlich möchte ich mich auch bei Igor Shapiro bedanken. Von dir konnte ich sehr viel lernen und ich denke, dass durch meine zum Teil interessante experimentelle Herangehensweise der Laboralltag häufig lustig war. Auch bei exakt gleicher Durchführung des Experiments waren deine Ergebnisse brauchbarer als meine, jedenfalls zu Beginn. Schade, dass du 2017 mit nach Zürich gegangen bist. Es war immer eine Freude mit dir zu arbeiten und auch nach der Arbeit über EVE online und Science-Fiction Bücher zu reden sowie darüber zu diskutieren, wie wir eventuell doch noch die Welt beherrschen könnten.

Ich danke auch Petra Rank für die Unterstützung im Labor, das Verschicken von Proben sowie dafür, dass du immer ein offenes Ohr für mich hattest. Des Weiteren bedanke ich mich bei Dr. Denis Ciato. Mit dir durfte ich einen Teil der Experimente durchführen und du hast mir auch immer

bei kleinen und größeren Problemen geholfen. Frau Dr. Nölting und Julian Maurer danke ich für das gemeinsame Durchführen des Primärkulturexperiments. Ein ganz herzliches Dankeschön gebührt auch Dr. Dunja Reiß und Dr. Miriam Peters für die Paper – Korrekturen, für meine diplomatische Charakterformung sowie den Koffein – und Schokoladensupport. Ohne euch wären die Mittagspausen manchmal gesünder ausgefallen, aber definitiv auch weniger schmackhaft. Ein ganz großes Dankeschön auch an unsere „Labor – Mama“, Brigitte Mauracher. Danke, dass du für mich immer einen Ratschlag hattest und danke vielmals für deine aufbauenden Worte, die immer zur richtigen Zeit kamen.

Der mit Abstand wichtigste Dank gebührt meiner Familie. Ich danke von ganzem Herzen meinen Mann Michael. Danke, dass du mich, trotz der wenigen Zeit füreinander, immer bei meinen beruflichen Zielen unterstützt hast und danke dafür, dass du mich, zum Glück, gelegentlich darauf hingewiesen hast, dass eine Doktorarbeit auch „nur ein Job“ ist. Ein riesiges Dankeschön möchte ich meinen Eltern (Annette und Steffen), Großeltern (Maria, Otto, Edelgard und Joachim) und meinem Bruder (Christoph) aussprechen. Danke für die zahlreichen Telefonate und die zum Teil sehr hilfreichen „Laienratschläge“. Ihr seid immer für mich da und auch wenn wir nicht immer einer Meinung sind, seid ihr immer auf meiner Seite. Dafür danke ich euch!

13. Kurzlebenslauf

Claudia Langer, geb. Siebert am 21.09.1990, Dessau – Roßlau, verheiratet

Ausbildung

05/2015 – 12/2015 Barbarossa – Apotheke München und Approbation als Apothekerin

11/2014 – 04/2015 Forschungsarbeit an der „University of Western Australia“ (Perth)

05/2014 – 10/2014 Teil des Praktischen Jahres in der „Elektra – Apotheke“ München

2009 – 2014 Studium der Pharmazie an der LMU München

2003 – 2009 Gymnasium Philanthropinum Dessau – Roßlau

2001 – 2003 Sekundarschule Dessau – Mildensee

1998 – 2001 Grundschule „Am Luisium“ Dessau – Waldersee

1997 – 1998 Grundschule Dessau – Mildensee

Beruflicher Werdegang

ab 02/2020 Sterillabor ApoPark München

08/2016 Promotion Dr. hum. biol. Klinikum der LMU München;

Apothekerin in der „Barbarossa – Apotheke“ München (Nebentätigkeit)

01/2016 – 07/2016 „Elektra – Apotheke“ München

14. Literaturverzeichnis

1. Lüllmann-Rauch, R., *Taschenlehrbuch Histologie:10 Tabellen 3. vollst. überarb. Aufl.* 2009: Stuttgart New York,NY:Thieme.
2. Schmidt, R.F., F. Lang, and M. Heckmann, *Physiologie Des Menschen.* 2011: Springer Berlin Heidelberg.
3. Welsch, U., *Lehrbuch Histologie 3. Aufl.* 2010: München:Elsevier, Urban & Fischer
4. Kong, M.F. and W. Jeffcoate, *Eighty-six cases of Addison's disease.* Clin Endocrinol (Oxf), 1994. **41**(6): p. 757-61.
5. Arlt, W. and B. Allolio, *Adrenal insufficiency.* Lancet, 2003. **361**(9372): p. 1881-93.
6. Conn, J.W., E.L. Cohen, and D.R. Rovner, *Suppression of Plasma Renin Activity in Primary Aldosteronism.* JAMA, 1964. **190**: p. 213-21.
7. Funder, J.W., et al., *Case detection, diagnosis, and treatment of patients with primary aldosteronism: an endocrine society clinical practice guideline.* J Clin Endocrinol Metab, 2008. **93**(9): p. 3266-81.
8. Corry, D.B. and M.L. Tuck, *Secondary aldosteronism.* Endocrinol Metab Clin North Am, 1995. **24**(3): p. 511-29.
9. Speiser, P.W. and P.C. White, *Congenital adrenal hyperplasia.* N Engl J Med, 2003. **349**(8): p. 776-88.
10. Ragnarsson, O. and G. Johannsson, *Cushing's syndrome: a structured short- and long-term management plan for patients in remission.* Eur J Endocrinol, 2013. **169**(5): p. R139-52.
11. Santos, A., et al., *Quality of Life in Patients With Cushing's Disease.* Front Endocrinol (Lausanne), 2019. **10**: p. 862.
12. Lotfi, C.F.P., et al., *The human adrenal cortex: growth control and disorders.* Clinics (Sao Paulo), 2018. **73**(suppl 1): p. e473s.
13. Fung, M.M., O.H. Viveros, and D.T. O'Connor, *Diseases of the adrenal medulla.* Acta Physiol (Oxf), 2008. **192**(2): p. 325-35.
14. Fassnacht, M., M. Kroiss, and B. Allolio, *Update in adrenocortical carcinoma.* J Clin Endocrinol Metab, 2013. **98**(12): p. 4551-64.

15. Gaujoux, S., et al., *European Society of Endocrine Surgeons (ESES) and European Network for the Study of Adrenal Tumours (ENSAT) recommendations for the surgical management of adrenocortical carcinoma*. Br J Surg, 2017. **104**(4): p. 358-376.
16. Berruti, A., et al., *Adrenal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. Ann Oncol, 2012. **23 Suppl 7**: p. vii131-8.
17. Luton, J.P., et al., *Clinical features of adrenocortical carcinoma, prognostic factors, and the effect of mitotane therapy*. N Engl J Med, 1990. **322**(17): p. 1195-201.
18. Ribeiro, R.C., et al., *An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(16): p. 9330-5.
19. Latronico, A.C., et al., *An inherited mutation outside the highly conserved DNA-binding domain of the p53 tumor suppressor protein in children and adults with sporadic adrenocortical tumors*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(10): p. 4970-3.
20. Libe, R., et al., *Somatic TP53 mutations are relatively rare among adrenocortical cancers with the frequent 17p13 loss of heterozygosity*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(3): p. 844-50.
21. Reincke, M., et al., *p53 mutations in human adrenocortical neoplasms: immunohistochemical and molecular studies*. J Clin Endocrinol Metab, 1994. **78**(3): p. 790-4.
22. Gaujoux, S., et al., *Wnt/beta-catenin and 3',5'-cyclic adenosine 5'-monophosphate/protein kinase A signaling pathways alterations and somatic beta-catenin gene mutations in the progression of adrenocortical tumors*. J Clin Endocrinol Metab, 2008. **93**(10): p. 4135-40.
23. Tissier, F., et al., *Mutations of beta-catenin in adrenocortical tumors: activation of the Wnt signaling pathway is a frequent event in both benign and malignant adrenocortical tumors*. Cancer Res, 2005. **65**(17): p. 7622-7.
24. Gicquel, C., et al., *Molecular markers and long-term recurrences in a large cohort of patients with sporadic adrenocortical tumors*. Cancer Res, 2001. **61**(18): p. 6762-7.
25. Ilvesmaki, V., et al., *Insulin-like growth factors (IGFs) and their receptors in adrenal tumors: high IGF-II expression in functional adrenocortical carcinomas*. J Clin Endocrinol Metab, 1993. **77**(3): p. 852-8.
26. Phan, L.M., et al., *Hepatocyte Growth Factor/cMET Pathway Activation Enhances Cancer Hallmarks in Adrenocortical Carcinoma*. Cancer Res, 2015. **75**(19): p. 4131-42.
27. Pereira, S.S., et al., *MAPK/ERK pathway inhibition is a promising treatment target for adrenocortical tumors*. J Cell Biochem, 2019. **120**(1): p. 894-906.

28. De Martino, M.C., et al., *Role of the mTOR pathway in normal and tumoral adrenal cells*. Neuroendocrinology, 2010. **92 Suppl 1**: p. 28-34.
29. Fassnacht, M., et al., *AKT is highly phosphorylated in pheochromocytomas but not in benign adrenocortical tumors*. J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(7): p. 4366-70.
30. Gazdar, A.F., et al., *Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses multiple pathways of steroid biosynthesis*. Cancer Res, 1990. **50**(17): p. 5488-96.
31. Wooten, M.D. and D.K. King, *Adrenal cortical carcinoma. Epidemiology and treatment with mitotane and a review of the literature*. Cancer, 1993. **72**(11): p. 3145-55.
32. Sbiera, S., et al., *High diagnostic and prognostic value of steroidogenic factor-1 expression in adrenal tumors*. J Clin Endocrinol Metab, 2010. **95**(10): p. E161-71.
33. Weiss, L.M., L.J. Medeiros, and A.L. Vickery, Jr., *Pathologic features of prognostic significance in adrenocortical carcinoma*. Am J Surg Pathol, 1989. **13**(3): p. 202-6.
34. Weiss, L.M., *Comparative histologic study of 43 metastasizing and nonmetastasizing adrenocortical tumors*. Am J Surg Pathol, 1984. **8**(3): p. 163-9.
35. Fassnacht, M., W. Kenn, and B. Allolio, *Adrenal tumors: how to establish malignancy ?* J Endocrinol Invest, 2004. **27**(4): p. 387-99.
36. Allolio, B. and M. Fassnacht, *Clinical review: Adrenocortical carcinoma: clinical update*. J Clin Endocrinol Metab, 2006. **91**(6): p. 2027-37.
37. Fassnacht, M., et al., *Combination chemotherapy in advanced adrenocortical carcinoma*. N Engl J Med, 2012. **366**(23): p. 2189-97.
38. Berruti, A., et al., *Etoposide, doxorubicin and cisplatin plus mitotane in the treatment of advanced adrenocortical carcinoma: a large prospective phase II trial*. Endocr Relat Cancer, 2005. **12**(3): p. 657-66.
39. Carneiro, B.A., et al., *Nivolumab in Metastatic Adrenocortical Carcinoma: Results of a Phase 2 Trial*. J Clin Endocrinol Metab, 2019. **104**(12): p. 6193-6200.
40. Naing, A., et al., *Phase 2 study of pembrolizumab in patients with advanced rare cancers*. J Immunother Cancer, 2020. **8**(1).
41. Pardoll, D. and C. Drake, *Immunotherapy earns its spot in the ranks of cancer therapy*. J Exp Med, 2012. **209**(2): p. 201-9.

42. Mota, J.M., et al., *Pembrolizumab for metastatic adrenocortical carcinoma with high mutational burden: Two case reports*. Medicine (Baltimore), 2018. **97**(52): p. e13517.
43. Kroiss, M., et al., *Objective response and prolonged disease control of advanced adrenocortical carcinoma with cabozantinib*. J Clin Endocrinol Metab, 2020.
44. Hantel, C., et al., *Targeting heterogeneity of adrenocortical carcinoma: Evaluation and extension of preclinical tumor models to improve clinical translation*. Oncotarget, 2016. **7**(48): p. 79292-79304.
45. Hantel, C. and F. Beuschlein, *Xenograft models for adrenocortical carcinoma*. Mol Cell Endocrinol, 2016. **421**: p. 28-33.
46. Humphreys, S.R., G. Sato, and A. Goldin, *Transplantation characteristics and response to chemotherapy of a murine adrenal tumor*. Eur J Cancer, 1965. **1**(2): p. 125-33.
47. Cohen, A.I., J. Furth, and R.F. Buffett, *Histologic and physiologic characteristics of hormone-secreting transplantable adrenal tumors in mice and rats*. Am J Pathol, 1957. **33**(4): p. 631-51.
48. Rainey, W.E., K. Saner, and B.P. Schimmer, *Adrenocortical cell lines*. Mol Cell Endocrinol, 2004. **228**(1-2): p. 23-38.
49. Yasumura, Y., V. Buonassisi, and G. Sato, *Clonal analysis of differentiated function in animal cell cultures. I. Possible correlated maintenance of differentiated function and the diploid karyotype*. Cancer Res, 1966. **26**(3): p. 529-35.
50. Pinto, E.M., et al., *Establishment and characterization of the first pediatric adrenocortical carcinoma xenograft model identifies topotecan as a potential chemotherapeutic agent*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(7): p. 1740-7.
51. Leibovitz, A., et al., *New human cancer cell culture lines. I. SW-13, small-cell carcinoma of the adrenal cortex*. J Natl Cancer Inst, 1973. **51**(2): p. 691-7.
52. Logie, A., et al., *Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma xenograft model*. Endocrinology, 2000. **141**(9): p. 3165-71.
53. Kiseljak-Vassiliades, K., et al., *Development of new preclinical models to advance adrenocortical carcinoma research*. Endocr Relat Cancer, 2018. **25**(4): p. 437-451.
54. Becker, J. and E.A. Craig, *Heat-shock proteins as molecular chaperones*. Eur J Biochem, 1994. **219**(1-2): p. 11-23.
55. Whitesell, L. and S.L. Lindquist, *HSP90 and the chaperoning of cancer*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(10): p. 761-72.

56. Chatterjee, S. and T.F. Burns, *Targeting Heat Shock Proteins in Cancer: A Promising Therapeutic Approach*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(9).
57. Zaarur, N., et al., *Targeting heat shock response to sensitize cancer cells to proteasome and Hsp90 inhibitors*. Cancer Res, 2006. **66**(3): p. 1783-91.
58. Bagatell, R., et al., *Induction of a heat shock factor 1-dependent stress response alters the cytotoxic activity of hsp90-binding agents*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(8): p. 3312-8.
59. Sakurai, H. and Y. Enoki, *Novel aspects of heat shock factors: DNA recognition, chromatin modulation and gene expression*. FEBS J, 2010. **277**(20): p. 4140-9.
60. Bjork, J.K. and L. Sistonen, *Regulation of the members of the mammalian heat shock factor family*. FEBS J, 2010. **277**(20): p. 4126-39.
61. Csermely, P., et al., *The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review*. Pharmacol Ther, 1998. **79**(2): p. 129-68.
62. Echeverria, P.C., et al., *Nuclear import of the glucocorticoid receptor-hsp90 complex through the nuclear pore complex is mediated by its interaction with Nup62 and importin beta*. Mol Cell Biol, 2009. **29**(17): p. 4788-97.
63. Sreedhar, A.S., et al., *Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance*. FEBS Lett, 2004. **562**(1-3): p. 11-5.
64. Dugyala, R.R., et al., *HSP90alpha, HSP90beta, and p53 expression following in vitro hyperthermia exposure in gestation day 10 rat embryos*. Toxicol Sci, 2002. **69**(1): p. 183-90.
65. Richter, K., M. Haslbeck, and J. Buchner, *The heat shock response: life on the verge of death*. Mol Cell, 2010. **40**(2): p. 253-66.
66. Yufu, Y., J. Nishimura, and H. Nawata, *High constitutive expression of heat shock protein 90 alpha in human acute leukemia cells*. Leuk Res, 1992. **16**(6-7): p. 597-605.
67. Jackson, S.E., *Hsp90: structure and function*. Top Curr Chem, 2013. **328**: p. 155-240.
68. Hawle, P., et al., *The middle domain of Hsp90 acts as a discriminator between different types of client proteins*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(22): p. 8385-95.
69. Scroggins, B.T., et al., *An acetylation site in the middle domain of Hsp90 regulates chaperone function*. Mol Cell, 2007. **25**(1): p. 151-9.

70. Meyer, P., et al., *Structural and functional analysis of the middle segment of hsp90: implications for ATP hydrolysis and client protein and cochaperone interactions*. Mol Cell, 2003. **11**(3): p. 647-58.
71. Prodromou, C., *Mechanisms of Hsp90 regulation*. Biochem J, 2016. **473**(16): p. 2439-52.
72. Hoter, A., M.E. El-Sabban, and H.Y. Naim, *The HSP90 Family: Structure, Regulation, Function, and Implications in Health and Disease*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(9).
73. Wolmarans, A., et al., *The Mechanism of Hsp90 ATPase Stimulation by Aha1*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 33179.
74. Zgajnar, N.R., et al., *Biological Actions of the Hsp90-binding Immunophilins FKBP51 and FKBP52*. Biomolecules, 2019. **9**(2).
75. Calderwood, S.K. and J. Gong, *Heat Shock Proteins Promote Cancer: It's a Protection Racket*. Trends Biochem Sci, 2016. **41**(4): p. 311-323.
76. Isaacs, J.S., W. Xu, and L. Neckers, *Heat shock protein 90 as a molecular target for cancer therapeutics*. Cancer Cell, 2003. **3**(3): p. 213-7.
77. Bagatell, R. and L. Whitesell, *Altered Hsp90 function in cancer: a unique therapeutic opportunity*. Mol Cancer Ther, 2004. **3**(8): p. 1021-30.
78. Pick, E., et al., *High HSP90 expression is associated with decreased survival in breast cancer*. Cancer Res, 2007. **67**(7): p. 2932-7.
79. Akerfelt, M., R.I. Morimoto, and L. Sistonen, *Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(8): p. 545-55.
80. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
81. Bertorelli, G., V. Bocchino, and D. Olivieri, *Heat shock protein interactions with the glucocorticoid receptor*. Pulm Pharmacol Ther, 1998. **11**(1): p. 7-12.
82. Fang, L., et al., *Unliganded and hormone-bound glucocorticoid receptors interact with distinct hydrophobic sites in the Hsp90 C-terminal domain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(49): p. 18487-92.
83. Riebold, M., et al., *A C-terminal HSP90 inhibitor restores glucocorticoid sensitivity and relieves a mouse allograft model of Cushing disease*. Nat Med, 2015. **21**(3): p. 276-80.
84. Agyeman, A.S., et al., *Hsp90 Inhibition Results in Glucocorticoid Receptor Degradation in Association with Increased Sensitivity to Paclitaxel in Triple-Negative Breast Cancer*. Horm Cancer, 2016. **7**(2): p. 114-26.

85. Neckers, L. and P. Workman, *Hsp90 molecular chaperone inhibitors: are we there yet?* Clin Cancer Res, 2012. **18**(1): p. 64-76.
86. Hyun, S.Y., et al., *Development of a novel Hsp90 inhibitor NCT-50 as a potential anticancer agent for the treatment of non-small cell lung cancer.* Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 13924.
87. Shiotsu, Y., et al., *Novel oxime derivatives of radicicol induce erythroid differentiation associated with preferential G(1) phase accumulation against chronic myelogenous leukemia cells through destabilization of Bcr-Abl with Hsp90 complex.* Blood, 2000. **96**(6): p. 2284-91.
88. Soga, S., et al., *KF25706, a novel oxime derivative of radicicol, exhibits in vivo antitumor activity via selective depletion of Hsp90 binding signaling molecules.* Cancer Res, 1999. **59**(12): p. 2931-8.
89. Zhang, F.Z., D.H. Ho, and R.H. Wong, *Triptolide, a HSP90 middle domain inhibitor, induces apoptosis in triple manner.* Oncotarget, 2018. **9**(32): p. 22301-22315.
90. Rosenhagen, M.C., et al., *The heat shock protein 90-targeting drug cisplatin selectively inhibits steroid receptor activation.* Mol Endocrinol, 2003. **17**(10): p. 1991-2001.
91. Blagosklonny, M.V., *Hsp-90-associated oncoproteins: multiple targets of geldanamycin and its analogs.* Leukemia, 2002. **16**(4): p. 455-62.
92. Zhao, H., et al., *Identification and initial SAR of silybin: an Hsp90 inhibitor.* Bioorg Med Chem Lett, 2011. **21**(9): p. 2659-64.
93. Sanchez, J., et al., *Old and New Approaches to Target the Hsp90 Chaperone.* Curr Cancer Drug Targets, 2019.
94. Grenert, J.P., et al., *The amino-terminal domain of heat shock protein 90 (hsp90) that binds geldanamycin is an ATP/ADP switch domain that regulates hsp90 conformation.* J Biol Chem, 1997. **272**(38): p. 23843-50.
95. Whitesell, L., et al., *Inhibition of heat shock protein HSP90-pp60v-src heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: essential role for stress proteins in oncogenic transformation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(18): p. 8324-8.
96. Schulte, T.W., et al., *Antibiotic radicicol binds to the N-terminal domain of Hsp90 and shares important biologic activities with geldanamycin.* Cell Stress Chaperones, 1998. **3**(2): p. 100-8.
97. Sharma, S.V., T. Agatsuma, and H. Nakano, *Targeting of the protein chaperone, HSP90, by the transformation suppressing agent, radicicol.* Oncogene, 1998. **16**(20): p. 2639-45.

98. Mimnaugh, E.G., C. Chavany, and L. Neckers, *Polyubiquitination and proteasomal degradation of the p185c-erbB-2 receptor protein-tyrosine kinase induced by geldanamycin*. J Biol Chem, 1996. **271**(37): p. 22796-801.
99. Schneider, C., et al., *Pharmacologic shifting of a balance between protein refolding and degradation mediated by Hsp90*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(25): p. 14536-41.
100. Jhaveri, K., et al., *Advances in the clinical development of heat shock protein 90 (Hsp90) inhibitors in cancers*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1823**(3): p. 742-55.
101. Supko, J.G., et al., *Preclinical pharmacologic evaluation of geldanamycin as an antitumor agent*. Cancer Chemother Pharmacol, 1995. **36**(4): p. 305-15.
102. DeBoer, C., et al., *Geldanamycin, a new antibiotic*. J Antibiot (Tokyo), 1970. **23**(9): p. 442-7.
103. Schulte, T.W. and L.M. Neckers, *The benzoquinone ansamycin 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin binds to HSP90 and shares important biologic activities with geldanamycin*. Cancer Chemother Pharmacol, 1998. **42**(4): p. 273-9.
104. Kelland, L.R., et al., *DT-Diaphorase expression and tumor cell sensitivity to 17-allylamino, 17-demethoxygeldanamycin, an inhibitor of heat shock protein 90*. J Natl Cancer Inst, 1999. **91**(22): p. 1940-9.
105. Egorin, M.J., et al., *Pharmacokinetics, tissue distribution, and metabolism of 17-(dimethylaminoethylamino)-17-demethoxygeldanamycin (NSC 707545) in CD2F1 mice and Fischer 344 rats*. Cancer Chemother Pharmacol, 2002. **49**(1): p. 7-19.
106. Kaur, G., et al., *Antiangiogenic properties of 17-(dimethylaminoethylamino)-17-demethoxygeldanamycin: an orally bioavailable heat shock protein 90 modulator*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(14): p. 4813-21.
107. Heath, E.I., et al., *A phase II trial of 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in patients with hormone-refractory metastatic prostate cancer*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(23): p. 7940-6.
108. Pacey, S., et al., *A Phase II trial of 17-allylamino, 17-demethoxygeldanamycin (17-AAG, tanespimycin) in patients with metastatic melanoma*. Invest New Drugs, 2012. **30**(1): p. 341-9.
109. Pedersen, K.S., et al., *Phase II trial of gemcitabine and tanespimycin (17AAG) in metastatic pancreatic cancer: a Mayo Clinic Phase II Consortium study*. Invest New Drugs, 2015. **33**(4): p. 963-8.

110. Ronnen, E.A., et al., *A phase II trial of 17-(Allylamino)-17-demethoxygeldanamycin in patients with papillary and clear cell renal cell carcinoma*. Invest New Drugs, 2006. **24**(6): p. 543-6.
111. Talaei, S., et al., *Spotlight on 17-AAG as an Hsp90 inhibitor for molecular targeted cancer treatment*. Chem Biol Drug Des, 2019.
112. Eccles, S.A., et al., *NVP-AUY922: a novel heat shock protein 90 inhibitor active against xenograft tumor growth, angiogenesis, and metastasis*. Cancer Res, 2008. **68**(8): p. 2850-60.
113. Proia, D.A. and R.C. Bates, *Ganetespib and HSP90: translating preclinical hypotheses into clinical promise*. Cancer Res, 2014. **74**(5): p. 1294-300.
114. Moser, C., et al., *Targeting HSP90 by the novel inhibitor NVP-AUY922 reduces growth and angiogenesis of pancreatic cancer*. Anticancer Res, 2012. **32**(7): p. 2551-61.
115. Chen, M.H., et al., *Gene expression-based chemical genomics identifies heat-shock protein 90 inhibitors as potential therapeutic drugs in cholangiocarcinoma*. Cancer, 2013. **119**(2): p. 293-303.
116. Taniguchi, H., et al., *Heat shock protein 90 inhibitor NVP-AUY922 exerts potent activity against adult T-cell leukemia-lymphoma cells*. Cancer Sci, 2014. **105**(12): p. 1601-8.
117. Chettiar, S.T., et al., *Ganetespib radiosensitization for liver cancer therapy*. Cancer Biol Ther, 2016. **17**(4): p. 457-66.
118. Proia, D.A., et al., *Synergistic activity of the Hsp90 inhibitor ganetespib with taxanes in non-small cell lung cancer models*. Invest New Drugs, 2012. **30**(6): p. 2201-9.
119. Ramalingam, S., et al., *A randomized phase II study of ganetespib, a heat shock protein 90 inhibitor, in combination with docetaxel in second-line therapy of advanced non-small cell lung cancer (GALAXY-1)*. Ann Oncol, 2015. **26**(8): p. 1741-8.
120. Friedland, J.C., et al., *Targeted inhibition of Hsp90 by ganetespib is effective across a broad spectrum of breast cancer subtypes*. Invest New Drugs, 2014. **32**(1): p. 14-24.
121. Piper, P.W. and S.H. Millson, *Mechanisms of Resistance to Hsp90 Inhibitor Drugs: A Complex Mosaic Emerges*. Pharmaceuticals (Basel), 2011. **4**(11): p. 1400-1422.
122. Wang, Y. and S.R. McAlpine, *N-terminal and C-terminal modulation of Hsp90 produce dissimilar phenotypes*. Chem Commun (Camb), 2015. **51**(8): p. 1410-3.

123. Zou, J., et al., *Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1*. Cell, 1998. **94**(4): p. 471-80.
124. Banerji, U., et al., *Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships for the heat shock protein 90 molecular chaperone inhibitor 17-allylamino, 17-demethoxygeldanamycin in human ovarian cancer xenograft models*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(19 Pt 1): p. 7023-32.
125. McCollum, A.K., et al., *P-Glycoprotein-mediated resistance to Hsp90-directed therapy is eclipsed by the heat shock response*. Cancer Res, 2008. **68**(18): p. 7419-27.
126. Maloney, A., P.A. Clarke, and P. Workman, *Genes and proteins governing the cellular sensitivity to HSP90 inhibitors: a mechanistic perspective*. Curr Cancer Drug Targets, 2003. **3**(5): p. 331-41.
127. Zhang, H., et al., *BIIB021, a synthetic Hsp90 inhibitor, has broad application against tumors with acquired multidrug resistance*. Int J Cancer, 2010. **126**(5): p. 1226-34.
128. Kataria, N., et al., *C-Terminal HSP90 Inhibitors Block the HIF-1 Hypoxic Response by Degrading HIF-1alpha through the Oxygen-Dependent Degradation Pathway*. Cell Physiol Biochem, 2019. **53**(3): p. 480-495.
129. Yun, B.G., et al., *Novobiocin induces a distinct conformation of Hsp90 and alters Hsp90-cochaperone-client interactions*. Biochemistry, 2004. **43**(25): p. 8217-29.
130. Marcu, M.G., et al., *The heat shock protein 90 antagonist novobiocin interacts with a previously unrecognized ATP-binding domain in the carboxyl terminus of the chaperone*. J Biol Chem, 2000. **275**(47): p. 37181-6.
131. Marcu, M.G., T.W. Schulte, and L. Neckers, *Novobiocin and related coumarins and depletion of heat shock protein 90-dependent signaling proteins*. J Natl Cancer Inst, 2000. **92**(3): p. 242-8.
132. Donnelly, A. and B.S. Blagg, *Novobiocin and additional inhibitors of the Hsp90 C-terminal nucleotide-binding pocket*. Curr Med Chem, 2008. **15**(26): p. 2702-17.
133. Deep, G. and R. Agarwal, *Antimetastatic efficacy of silibinin: molecular mechanisms and therapeutic potential against cancer*. Cancer Metastasis Rev, 2010. **29**(3): p. 447-63.
134. Imai-Sumida, M., et al., *Silibinin suppresses bladder cancer through down-regulation of actin cytoskeleton and PI3K/Akt signaling pathways*. Oncotarget, 2017. **8**(54): p. 92032-92042.
135. Belli, V., et al., *Regorafenib in combination with silybin as a novel potential strategy for the treatment of metastatic colorectal cancer*. Oncotarget, 2017. **8**(40): p. 68305-68316.

136. Hawke, R.L., et al., *Silymarin ascending multiple oral dosing phase I study in noncirrhotic patients with chronic hepatitis C*. J Clin Pharmacol, 2010. **50**(4): p. 434-49.
137. Raskovic, A., et al., *The protective effects of silymarin against doxorubicin-induced cardiotoxicity and hepatotoxicity in rats*. Molecules, 2011. **16**(10): p. 8601-13.
138. Sbiera, S., et al., *Hsp90 inhibition in adrenocortical carcinoma: Limited drug synergism with mitotane*. Mol Cell Endocrinol, 2019. **480**: p. 36-41.
139. Ianevski, A., et al., *SynergyFinder: a web application for analyzing drug combination dose-response matrix data*. Bioinformatics, 2017. **33**(15): p. 2413-2415.
140. Siebert, C., et al., *Heat Shock Protein 90 as a Prognostic Marker and Therapeutic Target for Adrenocortical Carcinoma*. Front Endocrinol (Lausanne), 2019. **10**: p. 487.
141. Miao, W., et al., *HSP90 inhibitors stimulate DNAJB4 protein expression through a mechanism involving N(6)-methyladenosine*. Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 3613.
142. Baldo, B., et al., *A screen for enhancers of clearance identifies huntingtin as a heat shock protein 90 (Hsp90) client protein*. J Biol Chem, 2012. **287**(2): p. 1406-14.
143. Marrugal, A., et al., *Impact of Heat Shock Protein 90 Inhibition on the Proteomic Profile of Lung Adenocarcinoma as Measured by Two-Dimensional Electrophoresis Coupled with Mass Spectrometry*. Cells, 2019. **8**(8).
144. Li, Q.Q., et al., *Proteomic analysis of proteome and histone post-translational modifications in heat shock protein 90 inhibition-mediated bladder cancer therapeutics*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 201.
145. Morimoto, R.I. and M.G. Santoro, *Stress-inducible responses and heat shock proteins: new pharmacologic targets for cytoprotection*. Nat Biotechnol, 1998. **16**(9): p. 833-8.
146. Agarwal, C., et al., *Silibinin upregulates the expression of cyclin-dependent kinase inhibitors and causes cell cycle arrest and apoptosis in human colon carcinoma HT-29 cells*. Oncogene, 2003. **22**(51): p. 8271-82.
147. Singh, R.P., et al., *Suppression of advanced human prostate tumor growth in athymic mice by silibinin feeding is associated with reduced cell proliferation, increased apoptosis, and inhibition of angiogenesis*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2003. **12**(9): p. 933-9.
148. Subramanian, C., et al., *Synthetic high-density lipoprotein nanoparticles: A novel therapeutic strategy for adrenocortical carcinomas*. Surgery, 2016. **159**(1): p. 284-94.

149. Sbiera, S., et al., *Mitotane Inhibits Sterol-O-Acyl Transferase 1 Triggering Lipid-Mediated Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis in Adrenocortical Carcinoma Cells*. Endocrinology, 2015. **156**(11): p. 3895-908.
150. Kroiss, M., et al., *Association of mitotane with chylomicrons and serum lipoproteins: practical implications for treatment of adrenocortical carcinoma*. Eur J Endocrinol, 2016. **174**(3): p. 343-53.
151. Volante, M., et al., *Ribonucleotide reductase large subunit (RRM1) gene expression may predict efficacy of adjuvant mitotane in adrenocortical cancer*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(12): p. 3452-61.
152. Singh, R.P., et al., *Oral silibinin inhibits lung tumor growth in athymic nude mice and forms a novel chemocombination with doxorubicin targeting nuclear factor kappaB-mediated inducible chemoresistance*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(24): p. 8641-7.
153. Kennedy, M.J., et al., *Phase I and pharmacologic study of the alkylating agent modulator novobiocin in combination with high-dose chemotherapy for the treatment of metastatic breast cancer*. J Clin Oncol, 1995. **13**(5): p. 1136-43.
154. Yang, Z., et al., *Silibinin restores the sensitivity of cisplatin and taxol in A2780-resistant cell and reduces drug-induced hepatotoxicity*. Cancer Manag Res, 2019. **11**: p. 7111-7122.
155. Zhang, Y., et al., *Synergistic apoptotic effects of silibinin in enhancing paclitaxel toxicity in human gastric cancer cell lines*. Mol Med Rep, 2018. **18**(2): p. 1835-1841.
156. Lai, C.H., et al., *HSP-90 inhibitor ganetespib is synergistic with doxorubicin in small cell lung cancer*. Oncogene, 2014. **33**(40): p. 4867-76.
157. Kosovec, J.E., et al., *Preclinical Study of AUY922, a Novel Hsp90 Inhibitor, in the Treatment of Esophageal Adenocarcinoma*. Ann Surg, 2016. **264**(2): p. 297-304.
158. Proia, D.A., et al., *Preclinical activity profile and therapeutic efficacy of the HSP90 inhibitor ganetespib in triple-negative breast cancer*. Clin Cancer Res, 2014. **20**(2): p. 413-24.
159. Guo, W., et al., *Enzymatic reduction and glutathione conjugation of benzoquinone ansamycin heat shock protein 90 inhibitors: relevance for toxicity and mechanism of action*. Drug Metab Dispos, 2008. **36**(10): p. 2050-7.
160. Kim, A.C., et al., *Targeted disruption of beta-catenin in Sf1-expressing cells impairs development and maintenance of the adrenal cortex*. Development, 2008. **135**(15): p. 2593-602.
161. Kirschner, L.S., *Signaling pathways in adrenocortical cancer*. Ann N Y Acad Sci, 2002. **968**: p. 222-39.

162. Chen, M.H., et al., *Antitumor activity of the combination of an HSP90 inhibitor and a PI3K/mTOR dual inhibitor against cholangiocarcinoma*. *Oncotarget*, 2014. **5**(9): p. 2372-89.
163. Chatterjee, M., et al., *The PI3K/Akt signaling pathway regulates the expression of Hsp70, which critically contributes to Hsp90-chaperone function and tumor cell survival in multiple myeloma*. *Haematologica*, 2013. **98**(7): p. 1132-41.
164. Gloesenkamp, C., et al., *Heat shock protein 90 is a promising target for effective growth inhibition of gastrointestinal neuroendocrine tumors*. *Int J Oncol*, 2012. **40**(5): p. 1659-67.
165. Dou, F., L.D. Yuan, and J.J. Zhu, *Heat shock protein 90 indirectly regulates ERK activity by affecting Raf protein metabolism*. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2005. **37**(7): p. 501-5.
166. Piatelli, M.J., C. Doughty, and T.C. Chiles, *Requirement for a hsp90 chaperone-dependent MEK1/2-ERK pathway for B cell antigen receptor-induced cyclin D2 expression in mature B lymphocytes*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(14): p. 12144-50.
167. Grbovic, O.M., et al., *V600E B-Raf requires the Hsp90 chaperone for stability and is degraded in response to Hsp90 inhibitors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(1): p. 57-62.
168. Schulte, T.W., et al., *Destabilization of Raf-1 by geldanamycin leads to disruption of the Raf-1-MEK-mitogen-activated protein kinase signalling pathway*. *Mol Cell Biol*, 1996. **16**(10): p. 5839-45.
169. Sato, S., N. Fujita, and T. Tsuruo, *Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(20): p. 10832-7.
170. Mahalingam, D., et al., *Targeting HSP90 for cancer therapy*. *Br J Cancer*, 2009. **100**(10): p. 1523-9.
171. Suzuki, R., et al., *Combination of a Selective HSP90alpha/beta Inhibitor and a RAS-RAF-MEK-ERK Signaling Pathway Inhibitor Triggers Synergistic Cytotoxicity in Multiple Myeloma Cells*. *PLoS One*, 2015. **10**(12): p. e0143847.
172. Jia, W., et al., *Synergistic antileukemic interactions between 17-AAG and UCN-01 involve interruption of RAF/MEK- and AKT-related pathways*. *Blood*, 2003. **102**(5): p. 1824-32.
173. Kirschke, E., et al., *Glucocorticoid receptor function regulated by coordinated action of the Hsp90 and Hsp70 chaperone cycles*. *Cell*, 2014. **157**(7): p. 1685-97.
174. Howard, K.J., et al., *Mapping the HSP90 binding region of the glucocorticoid receptor*. *J Biol Chem*, 1990. **265**(20): p. 11928-35.

175. McLaughlin, S.H. and S.E. Jackson, *Folding and stability of the ligand-binding domain of the glucocorticoid receptor*. Protein Sci, 2002. **11**(8): p. 1926-36.
176. Picard, D., et al., *Reduced levels of hsp90 compromise steroid receptor action in vivo*. Nature, 1990. **348**(6297): p. 166-8.
177. Bresnick, E.H., et al., *Evidence that the 90-kDa heat shock protein is necessary for the steroid binding conformation of the L cell glucocorticoid receptor*. J Biol Chem, 1989. **264**(9): p. 4992-7.
178. Vogeser, M. and F. Kirchhoff, *Progress in automation of LC-MS in laboratory medicine*. Clin Biochem, 2011. **44**(1): p. 4-13.
179. van den Ouweland, J.M. and I.P. Kema, *The role of liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the clinical laboratory*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2012. **883-884**: p. 18-32.
180. Cicalini, I., et al., *Serum Steroid Profiling by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry for the Rapid Confirmation and Early Treatment of Congenital Adrenal Hyperplasia: A Neonatal Case Report*. Metabolites, 2019. **9**(12).
181. Gomez-Gomez, A., et al., *Determination of the steroid profile in alternative matrices by liquid chromatography tandem mass spectrometry*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2019. **197**: p. 105520.
182. Hana, V., et al., *Novel GC-MS/MS Technique Reveals a Complex Steroid Fingerprint of Subclinical Hypercortisolism in Adrenal Incidentalomas*. J Clin Endocrinol Metab, 2019. **104**(8): p. 3545-3556.
183. Rahmani, H., et al., *Preparation and Characterization of Silk Fibroin Nanoparticles as a Potential Drug Delivery System for 5-Fluorouracil*. Adv Pharm Bull, 2019. **9**(4): p. 601-608.
184. Mortezaazadeh, T., et al., *In vitro and in vivo characteristics of doxorubicin-loaded cyclodextrine-based polyester modified gadolinium oxide nanoparticles: a versatile targeted theranostic system for tumour chemotherapy and molecular resonance imaging*. J Drug Target, 2019: p. 1-14.
185. Shi, H., et al., *Programmed co-delivery of platinum nanodrugs and gemcitabine by a clustered nanocarrier for precision chemotherapy for NSCLC tumors*. J Mater Chem B, 2019.
186. Sabra, R., N. Billa, and C.J. Roberts, *Cetuximab-conjugated chitosan-pectinate (modified) composite nanoparticles for targeting colon cancer*. Int J Pharm, 2019. **572**: p. 118775.

187. Ma, L., et al., *Co-delivery of paclitaxel and tanespimycin in lipid nanoparticles enhanced anti-gastric-tumor effect in vitro and in vivo*. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2018. **46**(sup2): p. 904-911.
188. Mellatyar, H., et al., *Comparison of inhibitory effect of 17-DMAG nanoparticles and free 17-DMAG in HSP90 gene expression in lung cancer*. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014. **15**(20): p. 8693-8.
189. Saxena, V., Y. Naguib, and M.D. Hussain, *Folate receptor targeted 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG) loaded polymeric nanoparticles for breast cancer*. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2012. **94**: p. 274-80.
190. Jung, S., et al., *Preclinical progress and first translational steps for a liposomal chemotherapy protocol against adrenocortical carcinoma*. *Endocr Relat Cancer*, 2016. **23**(10): p. 825-37.
191. Lambert, J.M., *Drug-conjugated antibodies for the treatment of cancer*. *Br J Clin Pharmacol*, 2013. **76**(2): p. 248-62.
192. Slamon, D.J., et al., *Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2*. *N Engl J Med*, 2001. **344**(11): p. 783-92.
193. Lewis Phillips, G.D., et al., *Targeting HER2-positive breast cancer with trastuzumab-DM1, an antibody-cytotoxic drug conjugate*. *Cancer Res*, 2008. **68**(22): p. 9280-90.
194. Smith, I., et al., *2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: a randomised controlled trial*. *Lancet*, 2007. **369**(9555): p. 29-36.
195. Bross, P.F., et al., *Approval summary: gemtuzumab ozogamicin in relapsed acute myeloid leukemia*. *Clin Cancer Res*, 2001. **7**(6): p. 1490-6.
196. Hoelzer, D., *Targeted therapy with monoclonal antibodies in acute lymphoblastic leukemia*. *Curr Opin Oncol*, 2013. **25**(6): p. 701-6.
197. Crowley, M.J., et al., *Prostate-Specific Membrane Antigen Is a Potential Antiangiogenic Target in Adrenocortical Carcinoma*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2016. **101**(3): p. 981-7.
198. Cosentini, D., et al., *Immunotherapy failure in adrenocortical cancer: where next?* *Endocr Connect*, 2018.
199. Le Tourneau, C., et al., *Avelumab in patients with previously treated metastatic adrenocortical carcinoma: phase 1b results from the JAVELIN solid tumor trial*. *J Immunother Cancer*, 2018. **6**(1): p. 111.

200. Peters, C. and S. Brown, *Antibody-drug conjugates as novel anti-cancer chemotherapeutics*. Biosci Rep, 2015. **35**(4).